

**Eine Analyse der DNA-Synthese
im embryonalen Säugetiergewebe
unter dem Einfluß
einiger embryotoxischer Pharmaka**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gerd Bochert
aus Berlin

1972
—

**Eine Analyse der DNA-Synthese
im embryonalen Säugetiergewebe
unter dem Einfluß
einiger embryotoxischer Pharmaka**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gerd Bochert
aus Berlin



Referent: Prof. Dr. D. Neubert

Korreferent: Prof. Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 1972

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

INHALT

1. Einleitung und Problemstellung

2. Allgemeine Vorbemerkungen zur Methode

3. Methoden

- 3.1. Durchführung der Tierversuche
- 3.2. Gewinnung hochgereinigter Zellkerne aus Ratten-embryonen
- 3.3. Extraktion von Zellkern-DNA
- 3.4. Charakterisierung der isolierten DNA
- 3.5. Enzymatische Hydrolyse der DNA zu Mononucleotiden
 - 3.5.1. Bereitung einer reinen Phosphodiesterase aus Schlangengift
 - 3.5.2. Bedingungen und Durchführung der enzymatischen Hydrolyse der DNA
- 3.6. Trennung der DNA-Mononucleotide
- 3.7. Hydrolyse und Trennung der DNA-Basen
- 3.8. Identität und quantitative Bestimmung der Mononucleotide und Basen
- 3.9. Feststellung der Verteilung der Radioaktivität auf die embryonalen Zellkomponenten
- 3.10. Messung der Radioaktivität
- 3.11. Zusammenfassung der Methode

4. Versuche über die radioaktive Markierbarkeit der Kern-DNA und ihrer Bausteine in-vivo

- 4.1. ^{14}C -Glucose und ^{32}P -Phosphat als Precursoren
- 4.2. Einbau der radioaktiven Vorstufen in einige Zellbestandteile des Embryos

4.3. Einbau von ^{14}C -Glucose und ^{32}P in die Kern-DNA und ihre Bausteine

4.4. Zusammenfassung von 4. und Diskussion

5. Analyse der Wirkung einiger bekannter embryo-toxischer Substanzen mit der entwickelten Methode

5.1. Untersuchungen mit Cytosin-Arabinosid

5.1.1. Untersuchungen zur Bestimmung der Dosierung

5.1.2. Untersuchungen über die Verteilung von Cytosin-Arabinosid nach der Injektion

5.1.3. Einfluß von Cytosin-Arabinosid auf die Synthese der DNA und ihrer Bausteine

5.1.3.1. Messung der Radioaktivität in hochgereinigter DNA, Mononucleotiden und Basen

5.1.4. Zusammenfassung und Diskussion

5.2. Untersuchungen mit 6-Mercaptopurin

5.2.1. Untersuchungen über die Verteilung von 6-Mercaptopurin nach der Injektion

5.2.2. Einfluß von 6-Mercaptopurin auf die Synthese der DNA und ihrer Bausteine

5.2.2.1. Messung des Einbaus von radioaktiven Vorstufen in hochgereinigte DNA, Mononucleotide und Basen

5.2.3. Zusammenfassung und Diskussion

6. Ausblick und Weiterführung der Experimente

7. Zusammenfassung

8. Literaturverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung

In den letzten Jahren sind in zunehmender Zahl Substanzen bekanntgeworden, die den Nucleinsäurestoffwechsel von Säugetierzellen beeinflussen. Dabei handelt es sich einmal um Substanzen, bei denen diese Wirkung aus therapeutischen Gründen beabsichtigt ist - z.B. Cytostatica -, zum anderen aber um rein toxische Substanzen. Wir haben uns besonders für Pharmaka mit embryotoxischer Wirkung interessiert. Als embryotoxische Substanz kann jedes Pharmakon bezeichnet werden, das in einem Embryo einen teratogenen oder einen letalen Effekt auslöst oder das Wachstum retardiert. Über die Art der Stoffwechselbeeinflussung und die Angriffspunkte solcher Pharmaka auf die Nucleinsäuresynthese herrscht noch vielfach Unklarheit. Dies trifft in besonderem Maße für Säugetiergewebe zu, nicht zuletzt wegen der heute noch unvollkommenen Kenntnisse der Steuerung der Differenzierungsvorgänge während der Organdetermination und der damit zusammenhängenden komplizierten Vorgänge der Transcription und Translation.

Untersuchungen über den Einfluß von Pharmaka auf den Nucleinsäurestoffwechsel sind auch an schnell wachsendem Gewebe möglich. Embryonales Gewebe zeigt dabei von allen Säugetiergeweben die höchste Wachstumsrate. Besonders im Stadium der Organogenese ist darum dieses Gewebe gegenüber Pharmakaeinflüssen recht empfindlich. Da z.B. ein Rattenembryo vom Tag 11 der Schwangerschaft an isoliert werden kann (bei der Maus vom Tag 9 an) sind biochemische Untersuchungen in der 2. Hälfte der Organogenese prinzipiell möglich.

Nucleinsäuren können auf zwei Wegen synthetisiert werden:

- a) Durch Synthese von Nucleinsäuresträngen aus "vorgefertigten Bausteinen, die aus der Hydrolyse von Nucleinsäure stammen, die nicht mehr benötigt werden (Salvage pathway).
- b) Durch vollständige Neusynthese der einzelnen Bausteine - Nucleotide -, die zur Synthese benötigt werden (de-novo-Synthese).

Auf Grund der hohen Wachstumsrate der Embryonen und der damit verbundenen Zunahme an Nucleinsäuren kann man annehmen, daß im embryonalen Gewebe die de-novo-Synthese die größere Bedeutung hat.

Seit einigen Jahren werden in unserem Institut Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel im embryonalen Gewebe mit Hilfe von radioaktiv markierten Vorstufen durchgeführt. Die Grundlage aller späteren Versuche bildete die Einführung einer Doppelmarkierungstechnik mit ^{14}C -Glucose und ^{32}P -Phosphat. Es konnte gezeigt werden, daß beide Vorstufen gut auf den Embryo übergehen und daß eine Reihe von hochmolekularen, säureunlöslichen Zellkomponenten ausreichend radioaktiv markiert wird, so daß eine Bestimmung der spezifischen Aktivität möglich ist. Die Entwicklung einer "Screening"-Methode führte schließlich zu einer Möglichkeit, Pharmakaeinflüsse auf die Synthese der einzelnen Zellkomponenten zu erfassen. Mit Hilfe dieser Methode gelingt es, schnell eine Übersicht über den Einfluß eines Pharmakons auf einige Haupt-Stoffwechselvorgänge im embryonalen Gewebe zu erhalten. Detaillierte Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel im Embryo wurden bisher nur an ribosomaler RNA durchgeführt (MEWES 1).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, in-vivo Untersuchungen über die Stoffwechselvorgänge der Zellkern-DNA in embryonalem Gewebe durchzuführen. Dazu war es nötig, Methoden zu entwickeln, die sowohl eine Isolierung der DNA, als auch die Spaltung dieser Nucleinsäure in ihre Komponenten und deren Trennung, ermöglichten. Vor allem galt es festzustellen, ob und in welcher Größenordnung die DNA-Basen mit Hilfe der oben angegebenen Isotopentechnik radioaktiv markiert werden.

Anschließend sollte die Methode mit bekannten embryotoxischen Substanzen, deren Beeinflussung des Nucleinsäurestoffwechsels im Screening-System nachgewiesen war, getestet werden.

2. Allgemeine Vorbemerkungen zur Methode

Als Versuchstiere wurden WISTAR-Ratten der Stämme SW 64 und SW 69 verwendet. ALTROMIN^R als Futter und Leitungswasser standen ihnen unbegrenzt zur Verfügung.

Die Schwangerschaftsdauer beträgt bei der Ratte etwa 21 Tage. Für Stoffwechseluntersuchungen ist besonders das Stadium der Organogenese interessant, da die hier ablaufenden Induktionsvorgänge besonders leicht beeinflussbar sind. Bei Ratten liegt dieses Stadium der embryonalen Entwicklung zwischen den Tagen 9 bis 13 der Schwangerschaft. Um stets Untersuchungsmaterial der gleichen Entwicklungsphase zu erhalten, ist es unbedingt erforderlich, eine sehr genaue Altersbestimmung der Embryonen durchzuführen.

Nach einer Paarungszeit von zwei Stunden wird eine stattgefundene Begattung durch Anwesenheit von Spermien im Vaginalabstrich nachgewiesen. Die darauffolgende 24-Stunden-Periode wird vereinbarungsgemäß als Tag 0 bezeichnet.

In der oben beschriebenen Entwicklungsphase der Organogenese verläuft das Wachstum des embryonalen Gewebes sehr schnell. Die Gewichtszunahme erreicht in der 24-Stunden-Periode von Tag 11 bis Tag 12 den Faktor sieben, von Tag 12 bis Tag 13 liegt er bei drei bis vier und er verringert sich in der Zeit zwischen Tag 13 und Tag 14 auf etwa zwei (KÖHLER et al. 2). Während dieser Zeit bildet sich auch die Placenta aus, die etwa um die Mitte des Tages 12 der Schwangerschaft voll funktionstüchtig wird. Für viele Substanzen stellt dieses Organ eine Sperre dar, die einen Übergang vom Muttertier auf den Embryo verhindert. Für die geplanten Untersuchungen scheint die Verwendung von Embryonen des Tages 11 oder noch darunter am interessantesten zu sein. Leider lassen aber methodische Schwierigkeiten solche Versuche nicht zu. 11-Tage-Embryonen weisen ein Feuchtgewicht von $3 \text{ mg} \pm 10 \%$ auf. Der DNA-Gehalt beträgt dabei etwa $17 \text{ } \mu\text{g}$. Das Präparieren von Embryonen, die jünger als 11 Tage alt sind, ist kaum möglich. Andererseits müßten bei 11 Tage alten Embryonen

zu viele Tiere verwendet werden, um eine ausreichende Menge an Untersuchungsmaterial zu erhalten. Für eine Versuchsserie, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben ist, würden wir etwa 60 schwangere Tiere (etwa 600 Embryonen) benötigen. Einen weiteren limitierenden Faktor stellt die für solche Versuche benötigte Menge an sehr teuren radioaktiv markierten Vorstufen dar. Aus diesen Gründen wurden alle in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen an 12-Tage-Embryonen durchgeführt, deren Feuchtgewicht 19 mg + 14 % und DNA-Gehalt etwa 90 µg beträgt.

3. Methoden

3.1. Durchführung der Tierversuche

Für jeden Versuch wurden 15-18 schwangere Ratten verwendet. Die Schwangerschaftsrate betrug in der Regel um 80 %. Eine Ratte trägt durchschnittlich 8-10 Embryonen, wobei mit einer Resorptionsrate von 2-10 % gerechnet werden muß. Mit Hilfe der später beschriebenen "Screening"-Methode wurden aus jeder Gruppe vier getrennte Voruntersuchungen durchgeführt. Dabei wurden jeweils drei Embryonen aus einem Tier für einen Versuchsansatz benutzt. Die Mittelwerte dieser Vierfachbestimmung lieferten in relativ kurzer Zeit einen Überblick über die Verteilung der Radioaktivität und über den Verlauf des Gesamtversuches. Zur Gewinnung der reinen Nucleinsäure und zur weiteren Aufschlüsselung verblieben aus jeder Gruppe 100-120 Embryonen, die dann gemeinsam aufgearbeitet wurden.

Im allgemeinen wurden Versuche mit einer maximalen Behandlungszeit von 5 Stunden durchgeführt. Die Dekapitation der Versuchstiere und Präparation der Embryonen erfolgte dann etwa 4-5 Stunden nach Beginn des Tages 12 der Schwangerschaft.

Bei den Versuchen mit Pharmaka wurde stets eine gleich große Tiergruppe als Kontrolle herangezogen und nach den gleichen Bedingungen aufgearbeitet. Die Gabe der Pharmaka erfolgte durch intraperitoneale Injektion 3 bzw. 5 Stunden vor der Dekapitation. Das Injektionsvolumen betrug 1 ml/200 g Tier. Die Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Menge des für die Pharmaka verwendeten Lösungsmittels intraperitoneal injiziert.

Die Applikation einer Mischung der radioaktiv markierten Substanzen ^{32}P und ^{14}C -Glucose - erfolgte 3 Stunden vor der Dekapitation durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene. Die Injektionsmenge betrug auch hier 1 ml/200 g Tier. Die Aktivität betrug 1 mCi/kg Tier für jede der beiden Substanzen (gelöst in physiologischer Kochsalzlösung). Zur

Kontrolle wurde die Radioaktivität in jeder Charge der Injektionslösungen bestimmt.

3.2. Gewinnung hochgereinigter Zellkerne aus Ratten-embryonen

Die von uns durchgeführten Tierversuche waren so angelegt worden, daß aus den gleichen Embryonen sowohl ribosomale RNA als auch Zellkern-DNA gewonnen werden konnte. Neben größerer Wirtschaftlichkeit ermöglicht ein solches Vorgehen einen besseren Überblick über den gesamten Nucleinsäurestoffwechsel. Hierfür mußte ein Verfahren gefunden werden, mit dem die Zellkerne vom cytoplasmatischen Anteil gut getrennt und anschließend weiter gereinigt werden konnten. Gleichzeitig sollte eine Veränderung der RNA durch RNasen weitgehend verhindert werden.

Eine heute gebräuchliche Methode zur Isolierung von Zellkernen aus Säugetiergeweben ist das Verfahren nach SCHNEIDER u. PETERMAN (3) unter Verwendung von Saccharose-Lösung mit Zusatz von Calciumchlorid. Ähnliche Verfahren wurden von PHILPOT u. STANIER (4) und WIDNELL u. TATA (5) beschrieben. Die Methoden unterscheiden sich hauptsächlich in der Konzentration der Saccharose und der Art und Menge des zweivalenten Kations (Ca^{++} , Mg^{++}). Nach Homogenisieren des Gewebes in der entsprechenden Saccharose-Lösung wird das Homogenat im allgemeinen durch mehrere Lagen Mull gegeben, um Bindegewebe und grobe Partikel zu entfernen. Dieser Schritt kann bei dem sehr zarten embryonalen Gewebe entfallen. Anschließend erfolgt die Trennung der Kerne durch Differential-Zentrifugation. Durch Zugabe von Diaethylpyrocarbonat (= BAYCOVIN^R) (1%) zum Homogenisationsmedium kann eine aus dem Rohrzucker stammende Kontamination durch RNasen ausgeschaltet werden. Die im Material selbst vorliegenden RNasen wurden durch Herabsetzen des pH-Wertes der Saccharose-Lösung auf 5.2 mit Natrium-Acetat-Puffer stark in ihrer Aktivität vermindert.

Die Trennung des cytoplasmatischen Anteils von den Kernen

wurde wie folgt durchgeführt: Nach Töten der Tiere durch Dekapitation wurden die Embryonen herauspräpariert und in 0.32 molarer Saccharose-Lösung mit 3mM Magnesiumchlorid kurz gewaschen. Dadurch wurden die Embryonen von anhängendem löslichen Material aus dem Fruchtwasser befreit. Zu je 10 der 12-Tage-alten Embryonen wurde 1 ml 0.32 molarer Saccharose-Lösung mit 3 mM Magnesiumchlorid und 10 mM Natriumacetat pH 5.2 gegeben und mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (5ml) 1 Minute bei 1000 Umdrehungen/Minute homogenisiert. Das Homogenat wurde in einer Mistral-4L-Zentrifuge (MSE) 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen/Minute (= ca. 700 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und als "RNA-Fraktion" weiterbehandelt.

Das Sediment enthielt die rohen Kerne. Sie waren noch mit ganzen Zellen und anhaftendem cytoplasmatischen Material verunreinigt.

Zur Gewinnung einer hochgereinigten Kernfraktion wurde mehrmals - in der Regel 8-10 mal - in eisgekühlter 0.025 molarer Citronensäure-Lösung pH 2.1 kurz homogenisiert, in einer Christ-Junior-KS-Kühlzentrifuge 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Das Auftreten eines völlig klaren Überstandes wurde als Ende des "Waschens" angesehen.

Diese Methode wurde erstmals von DOUNCE (6) zur Isolierung und Reinigung von Kernen aus Ratten-Leber-Gewebe verwendet. Erfolgt die Behandlung bei pH-Werten unter 3.0, so werden Kerne erhalten, die sich besonders gut zur späteren Gewinnung von Nucleinsäuren eignen. DOUNCE (7,8) konnte zeigen, daß unter diesen Bedingungen eine deutliche Verringerung hochmolekularer Proteinanteile des Kerns resultiert, wodurch eine spätere DNA-Isolierung erleichtert wird. Gleichzeitig sorgt der niedrige pH-Wert und die Entfernung der Magnesium-Ionen durch Komplexbildung mit Citronensäure für eine Hemmung der DNase-Aktivität.

Aufgrund der sorgfältigen Reinigung der Kernfraktion kann für die später isolierte DNA eine Kontamination durch

Nucleinsäuren, die nicht aus dem Kern stammen (z.B. aus Mitochondrien), ausgeschlossen werden.

3.3. Extraktion von Zellkern-DNA

Verwendet man zur radioaktiven Markierung "unspezifische" Precursoren, wie etwa ^{14}C -Glucose, so erhält man einen Einbau der Radioaktivität in sämtliche säureunlösliche Zellkomponenten (KROWKE 9). Ein speziell zu untersuchendes Produkt muß daher in hochgereinigter Form isoliert werden. Schon geringe Verunreinigungen, die mengenmäßig nicht ins Gewicht fallen, können zu beträchtlicher Verfälschung der spezifischen Aktivität führen. Unter diesem Gesichtspunkt war es notwendig, eine DNA zu isolieren, die möglichst vollständig frei von Proteinen, Polysacchariden und RNA ist.

Das eigentliche Problem bei der DNA-Isolierung liegt im Herauslösen des Nucleoprotein-Komplexes aus dem Kern und der anschließenden Trennung von DNA, ohne den "nativen" Charakter der Nucleinsäure zu zerstören. Besondere Schwierigkeiten stellt die vollständige Befreiung der DNA vom Protein dar. Gelingt eine quantitative Dissoziation der DNA aus dem Protein-Komplex nicht, so wird beim Ausfällen der Nucleinsäure ein Teil des Proteins mitgefällt.

In frühen Arbeiten extrahierten die Untersucher den Nucleoprotein-Komplex mit Salzlösungen - meist Natriumchlorid - und entfernten daraus das Protein durch Schütteln mit Chloroform (SEVAG et al. 10, GANDELMAN et al. 11, SMITH u. WYATT 12). Nach Trennung beider Phasen durch Zentrifugieren verbleibt das denaturierte Protein an der Grenzschicht, die Nucleinsäuren befinden sich gelöst in der wäßrigen Phase. Ein geringer Zusatz von Octanol oder Isoamylalkohol zum Chloroform reduziert die Schaumbildung beim Schütteln und erhält die Stabilität der Schichten nach dem Zentrifugieren. Als Nachteile dieser Methoden sind geringe Ausbeuten und ungenügende Reinheit der DNA zu nennen.

MARKO u. BUTLER (13) und später KAY et al. (14) beschrieben Verfahren unter Verwendung von Laurylsulfat (SDS), einem

anionischen Emulgator, als Deproteinisierungsmittel zur Isolierung von DNA aus Säugetiergeweben. Laurylsulfat verursacht außerdem eine Lysis der Zell- bzw. Kern-Lipoprotein-Membran und ist als guter Nucleasen-Inhibitor bekannt.

Nach Untersuchungen über die Bindungsverhältnisse im Protein-DNA-Komplex wurde von KIRBY (15) vermutet, daß zweiwertige Metallionen durch Chelatbildung zwischen DNA und Protein die Festigkeit innerhalb des Komplexes bedingen. Ein nur sehr geringer Anteil an Protein in DNA-Extraktionen, die in Gegenwart von Komplexbildnern - wie z.B. p-Aminosalicylsäure, EDTA oder Natriumcitrat - gewonnen wurden, schien diese Annahme zu bestätigen.

MARMUR (16) kombinierte die einzelnen Verfahren und entwickelte daraus eine Methode zur Isolierung von DNA aus Bakterien, die später auch für Säugetiergewebe Anwendung fand (SAVITZKY 17, ARRIGHI et al. 18). Er benutzte zur Extraktion eine Lösung von NaCl-EDTA-SDS (0.15 M - 0.1 M - 2 %). Nach Zusatz von 1.0 M NaClO₄ wurde mit Chloroform-Isoamylalkohol deproteinisiert. Die hohe Konzentration an NaClO₄ soll dabei eine bessere Dissoziation der DNA aus dem Protein-Komplex bewirken. Die Ausbeute an hochgereinigter DNA wurde von MARMUR (16) mit 50 % angegeben.

Durch geeignete Modifizierung konnte die ursprünglich für die RNA-Isolierung eingeführte Phenol-Methode auch zur Extraktion von DNA verwendet werden (KIRBY 15, COLTER et al. 19). In mehreren Arbeiten verbesserte KIRBY (20)(21)(22) dieses Verfahren. So benutzte er statt einer Phenol-Wasser-Mischung eine Mischung aus wassergesättigtem Phenol mit 140 ml m-Kresol und 1 g 8-Hydroxyquinolin pro Liter. Neben einer Verminderung der Oxydation des Phenols wurde die Denaturierung der Proteine und der Übertritt in die Phenol-Phase durch m-Kresol deutlich gesteigert.

SAITO u. MIURA (23) isolierten DNA aus Bakterien sowohl nach der Methode von MARMUR (16) als auch mit Hilfe von Phenol. Sie fanden, daß DNA, nach der Phenol-Methode isoliert, einen

hohen Anteil an RNA enthält. Gleichzeitig war die Ausbeute gegenüber der Methode nach MARMUR geringer. Verwendeten sie ein Extraktionsmedium mit erhöhtem pH-Wert (8-9), so wurde die Ausbeute erheblich gesteigert, der Anteil an RNA verringerte sich. Die Kontamination durch RNA war aber auch dann noch weit größer als bei der Methode von MARMUR. Der Gehalt an Protein beider DNA-Fraktionen wurde mit weniger als 1 % angegeben.

Die geringe Menge des uns zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterials - Embryonen von etwa 100 mg Trockengewicht pro Extraktionsansatz - verlangte vor allem eine Isolierungsmethode, die eine gute Ausbeute an sehr reiner DNA gewährleistete. Die für die Isolierung verwendeten Reagenzlösungen sind nachfolgend einzeln aufgeführt. Zur Vereinfachung der Beschreibung werden anschließend nur die allgemein in der Literatur üblichen Abkürzungen verwendet.

Zur Vermeidung einer Adsorption der Nucleinsäure an Glas, besonders bei Fällungsschritten, wurden während des gesamten unten beschriebenen Verfahrens nur silikonisierte Glasgeräte benutzt.

NaCl-EDTA-Lösung	= 0.15 M NaCl + 0.1 M EDTA	pH 8.0
SDS-Lösung	= Laurylsulfat 20 % (H ₂ O) (sodium dodecyl Sulfate)	pH 8.0
Phenol-Lösung	= 140 ml m-Kresol + 1 g 8-Hydroxy- quinolin pro Liter wassergesättig- tes Phenol	
SSC-Lösung	= 0.15 M NaCl + 0.015 M Na-citrat	pH 7.0
verd.SSC-Lösung	= 0.015M NaCl + 0.0015M Na-citrat	pH 7.0
konz.SSC-Lösung	= 1.5 M NaCl + 0.15 M Na-citrat	pH 7.0

Die gereinigten Kerne wurden in NaCl-EDTA-Lösung suspendiert und die Mischung mit einigen Tropfen 0.1 M NaOH auf pH 8.0 eingestellt. Nach Zugabe von SDS-Lösung (Endkonzentration 2%) wurde die Suspension kurz bei 500 Umdrehungen/Minute homogenisiert, mit gleichem Volumen Phenol-Lösung versetzt und

eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugieren bei 5000 Umdrehungen/Minute - 20 Minuten - in einer Christ-Laborzentrifuge. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und die Phenolphase mit einer kleinen Menge NaCl-EDTA-Lösung nachextrahiert. Die zwischen Phenol- und Wasserphase verbliebene Schicht (Interphase) wurde nochmals einer gesamten Phenol-Extraktion unterzogen, nur mit kleineren Volumina und kürzeren Extraktions-Zeiten. Die aus den drei Extraktionen gesammelten wäßrigen Phasen wurden dann nochmals mit gleichem Volumen frischer Phenol-Lösung 30 Minuten geschüttelt und anschließend die Phasen getrennt.

Der stark viskose Überstand wurde mit NaClO_4 auf eine Konzentration von 1.0 molar gebracht und mit gleichem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24 + 1 V/V) 30 Minuten geschüttelt. Nach fünfzehnminütigem Zentrifugieren hatten sich drei Phasen gebildet, Chloroform - Interphase - Wasser. Die wäßrige Phase war nun fast klar und konnte leicht von der Interphase entfernt werden. Je nach Trübungsgrad dieser Schicht und Größe der Interphase wurden weitere Chloroform-Extraktionen angeschlossen. Bildete die obere Phase eine klare viskose Lösung, so wurde sie abpipettiert und in ein 100 ml Becherglas gegeben. Zum Ausfällen der Nucleinsäuren wurde die Lösung mit doppeltem Volumen Aethanol (-20°) überschichtet und die Mischung etwa 30 Minuten stehen gelassen. Nachdem sich an der Grenze beider Lösungen eine Schicht gebildet hatte, wurden durch vorsichtiges Bewegen des Becherglases beide Medien weiter vermischt. Die quantitative Fällung erfolgte über Nacht im Tiefkühlschrank bei -20° . Die ausgefällte DNA schwamm als gallertartige Masse in der Flüssigkeit, wogegen ein Teil hochmolekularer RNA sich am Boden des Gefäßes sammelte. Die DNA wurde herausgenommen und in 70%igem Aethanol und zuletzt in absolutem Aethanol gewaschen.

Die so isolierte DNA enthält noch Spuren von RNA und eventuell geringe Mengen an Polysacchariden. Durch enzymatische Behandlung mit RNase und α -Amylase lassen sich beide Verunreinigungen leicht entfernen. Die Makromoleküle werden dabei in kleine Bruchstücke gespalten, die anschließend bei der Aethanolfällung der DNA nicht mehr mitgefällt werden.

Die andere Möglichkeit zur Entfernung von RNA und Polysacchariden aus DNA-Fractionen wurde von MARMUR (16) vorgeschlagen. Statt mit Aethanol kann mit Isopropylalkohol gefällt werden. Damit wird selektiv DNA gefällt, RNA und Polysaccharide verbleiben in der Lösung. Als Nachteil wurde von uns festgestellt, daß die DNA nach diesem Schritt nicht quantitativ wiedergewonnen wird. Bei einem Vergleich zwischen RNase-behandelter und mit Isopropylalkohol gefällter DNA konnten wir keinen Unterschied hinsichtlich der Reinheit feststellen.

Für die enzymatische Behandlung wurde die DNA in verdünnter SSC-Lösung bei 37° unter Rühren gelöst und danach die Ionenstärke durch Zugabe von 1/10 des Volumens an konzentrierter SSC-Lösung angehoben. DNA löst sich in verdünnten Salzlösungen schneller. DNase-freie RNase (Firma Worthington Biochem. Corp.) und α -Amylase (Firma Boeringer) wurden in einer Endkonzentration von je 50 μ g/ml zu der DNA-Lösung hinzugegeben und 30 Minuten bei 37° stehen gelassen. Zur Entfernung des Proteins aus den Enzymen mußte danach noch zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert werden. Die DNA wurde mit doppeltem Volumen Aethanol - wie oben beschrieben - ausgefällt, mehrmals gewaschen und im Vakuum getrocknet.

3.4. Charakterisierung der isolierten DNA

Nucleinsäuren lassen sich am einfachsten durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums im UV-Bereich identifizieren. Das charakteristische Spektrum mit dem Maximum bei 258 nm und dem Minimum bei 230 nm ist für beide Nucleinsäuren fast identisch. Ein Unterschied besteht nur in der Lage eines Maximums zwischen 200 nm und 210 nm, das aber mit herkömmlichen Photometern kaum festgestellt werden kann (BASU u. DASGUPTA **24**). Die Abbildung 1 zeigt das UV-Spektrum einer nach der oben beschriebenen Methode isolierten DNA.

Die Extinktionsverhältnisse von 260 nm zu 230 nm und von 260 nm zu 280 nm werden häufig als Nachweis der Identität und Reinheit extrahierter Nucleinsäuren verwendet (MARMUR **16**, SAVITZKY **17**, ARRIGHI **18**). Damit kann besonders die Gegenwart von Protein angezeigt werden, das sein Maximum bei 280 nm hat. In der Tabelle 1 werden einige Extinktionsverhältnisse aus der Literatur den von uns gefundenen Werten gegenübergestellt. Die Relationen von 2.32 und 1.90 sprechen für eine hohe Reinheit der von uns isolierten DNA.

Eine quantitative Bestimmung der DNA war sowohl für eine Ausbeute-Berechnung, als auch zur Bestimmung der DNA-Konzentration in den später durchgeführten Hydrolyseansätzen wünschenswert. Die sonst allgemein übliche Bestimmungsmethode nach BURTON (**25**) konnte wegen des dabei auftretenden Materialverlustes nicht angewendet werden. Von MINTARI (**26**) wurde eine direkt aus der Extinktion bei 260 nm errechenbare DNA-Bestimmung angegeben. Voraussetzung war dazu eine DNA im nativen Zustand und ein Proteinanteil von weniger als einem Prozent. Untersuchungen von DASGUPTA et al. (**27**) bestätigten diese Methode, sofern die Bestimmung in Gegenwart einer Salzkonzentration zwischen 150 μ M und 15 mM durchgeführt wird. Unter den angegebenen Bedingungen (1 cm Schichtdicke) entsprechen 40 μ g DNA pro Milliliter einer Extinktion bei 260 nm von 1.000. Aus den quantitativen Bestimmungen nach der Extinktionsmessung ergibt sich für unsere Methode eine durchschnittliche Ausbeute an hochgereinigter DNA von 60 % der in den Kernen insgesamt vorliegenden Menge.

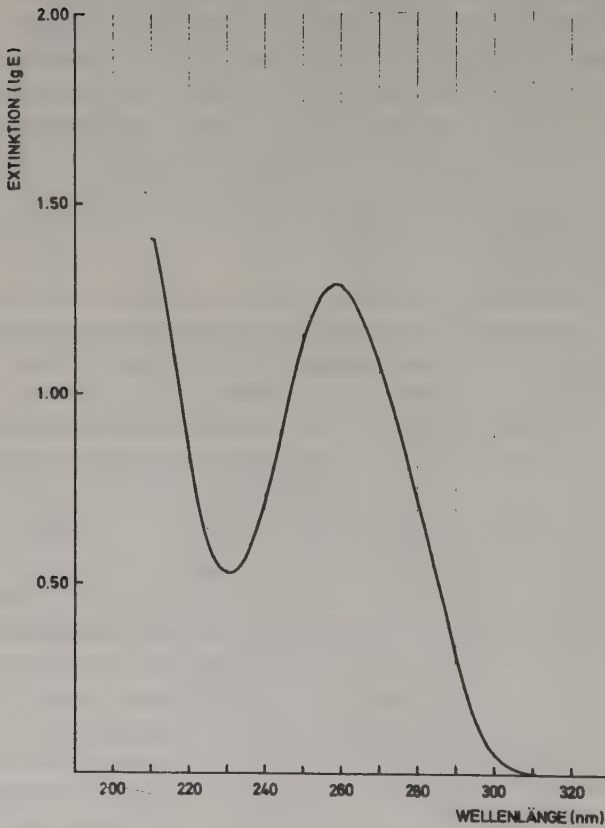


Abbildung 1

UV-Spektrum einer aus Ratten-Embryonen isolierten Kern-DNA. Als Lösungsmittel wurde 15 mM NaCl pH 7.0 verwendet. Die Aufnahme erfolgte mit einem Unicam SP 1800 UV-Spektrophometer.

Species	E $\frac{260}{230}$ nm	E $\frac{260}{280}$ nm	Autor
B. subtilis	2.22	1.93	MARMUR (16)
B. coli	2.11	1.84	ARRIGHI(18)
Hamster Don C-Zellen	2.14	1.88	
Hamster Leber	2.51	1.88	
Maus LM-Zellen	2.45	1.89	
Kalb Thymus	2.21	1.89	SAVITZKY(17)
Kaninchen Leber	2.32	1.86	
Ehrlich Ascites Zell.	2.17	1.88	
Ratten Embryo	2.32 ± 0.04	1.90 ± 0.01	

Tabelle 1

In der Literatur angegebene Extinktionsverhältnisse für DNA verschiedener Species. Zum Vergleich dazu die von uns für Kern-DNA aus Ratten-Embryonen gefundenen Werte. Sie stellen Mittelwerte aus 7 Bestimmungen dar.

Drei der vier DNA-Basen sind mit denen der RNA identisch. Eine Verunreinigung der DNA durch RNA würde daher die spätere Basenbestimmung stören. Zur Trennung der beiden Nucleinsäuren kann ihr unterschiedliches Verhalten gegenüber Alkalien ausgenutzt werden. Während die RNA dabei vollständig zu Mononucleotiden hydrolysiert wird, bleibt die DNA nahezu unverändert (MUNROE 28). Nach dem Ansäuern bleiben die RNA-Mononucleotide in Lösung und die DNA wird ausgefällt. SAVITZKY u. STAND (29) zeigten, daß dabei weit weniger als ein Prozent an DNA in der Lösung bleibt. Da beide Nucleinsäuren bei unseren Versuchen radioaktiv markiert sind, kann eine im sauren Überstand festgestellte Radioaktivität in der Hauptsache nur aus der RNA stammen. Diese Reinheitskontrolle wurde sowohl mit RNase behandelter DNA, als auch mit einer DNA, die nach der RNase-Behandlung noch aus Isopropylalkohol umgefällt wurde (MARMUR 16), durchgeführt. Je 100 µg DNA wurden 14 Stunden lang mit 0.3n KOH bei 37° behandelt. Danach wurde die Lösung auf 0° abgekühlt, die ¹⁴C- und ³²P-Aktivität bestimmt und mit Perchlorsäure auf pH 2 gebracht. Die ausgefällte DNA und unlösliches Kaliumperchlorat wurden abzentrifugiert und zweimal mit PCS gewaschen. Die Messung der Radioaktivität in den gesammelten Überständen erfolgte in einem Flüssigkeits-Szintillations-Zähler. In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Danach liegt die Verunreinigung nach der Radioaktivitätsmessung unter 0.5 %. In dieser Größenordnung liegt aber die in Lösung verbliebene DNA-Menge, so daß RNA nicht nachgewiesen werden konnte. Ein Umfällen der DNA unter Verwendung von Isopropylalkohol bringt hinsichtlich der Reinheit keine Vorteile.

Messung		dpm ^{14}C	dpm ^{32}P
I	Hydrolysats	3592	4046
	Überstand	22	24
II	Hydrolysats	3430	3872
	Überstand	17	17

Tabelle 2

Alkalische Behandlung einer in-vivo markierten und nach unserer Methode isolierten DNA zur Prüfung auf Verunreinigungen durch RNA. Es wurde die Radioaktivität des alkalischen Hydrolysats und der sauren Lösung nach DNA-Fällung gemessen. Die Prüfung erfolgte an RNase-behandelter DNA (I) und an DNA, die danach noch mit Isopropanol umgefällt wurde (II).

3.5. Enzymatische Hydrolyse der DNA zu Mononucleotiden

Im Gegensatz zur RNA läßt sich die DNA nicht einfach chemisch zu Mononucleotiden abbauen. Eine Hydrolyse zu DNA-Nucleotiden kann nur mit Hilfe von Enzymen durchgeführt werden. Die hierzu erforderlichen Enzyme gehören in die Gruppe der Hydrolasen. Ihre Angriffspunkte sind die Phosphodiesterbindungen. Je nach Spezifität des verwendeten Enzyms wird entweder die 3'-Phosphatbindung gespalten, wobei 5'-Mononucleotide erhalten werden, oder der Angriff erfolgt an der 5'-Phosphatbindung unter Bildung von 3'-Mononucleotiden. Für unsere Methode wählten wir Enzyme, die nach der Hydrolyse 5'-Mononucleotide lieferten. Da die Biosynthese der DNA aus 5'-Nucleotiden erfolgt, werden somit Nucleotide erhalten, deren Phosphatgruppe schon während der de-novo-Synthese α -ständig eingebaut wurde. Mit Hilfe der ^{32}P -Markierung bietet sich hier

die Möglichkeit an, mehr über den Phosphatstoffwechsel während der Synthese zu den einzelnen Nucleotiden zu erfahren.

Die von uns durchgeführte enzymatische Hydrolyse erfolgte in zwei Stufen. Für die erste Aufspaltung der nativen DNA wurde DNase I aus Pankreas verwendet. DNase I, eine typische Endonuclease, baut die DNA zu Oligonucleotiden - vorwiegend Tetranucleotiden - mit einer Phosphatestergruppe am C-5' der abschließenden Deoxyribose ab (VANECKO u. LASKOWSKI 30). Mononucleotide werden dabei nur in sehr kleinen Mengen (etwa 1 %) gebildet (SINSHEIMER 31). Eine Hydrolyse zu Nucleosiden kann ausgeschlossen werden, wie spätere Untersuchungen von VANECKO u. LASKOWSKI (32) zeigten. DNase I benötigt zur Aktivierung Magnesium- oder Manganionen und hat sein Wirkungsoptimum bei pH 6.5 - 7.5 (TAMM u. CHARGAFF 33).

Die zweite Stufe der Hydrolyse wurde mit einer Schlangengift-Phosphodiesterase durchgeführt. Dieses Enzym wirkt als Exonuclease und spaltet die Oligonucleotide spezifisch in 3'-Mononucleotide. Auch hierfür werden Magnesiumionen benötigt. Das pH-Optimum liegt zwischen 8.6 - 9.2.

3.5.1. Bereitung einer reinen Phosphodiesterase aus Schlangengift

Schon kleine Mengen gereinigter Phosphodiesterase sind ausgesprochen teuer. Da für unsere Versuche eine relativ große Menge benötigt wurde, versuchten wir eine Reinigung und Anreicherung des Enzyms selbst vorzunehmen. Als Ausgangsmaterial wird im allgemeinen dafür rohes, gefriergetrocknetes Schlangengift verschiedener Species verwendet.

Bei der Behandlung von DNA mit ungereinigtem Schlangengift erhält man eine quantitative Hydrolyse zu Nucleosiden (COHN 34). Diese Reaktion wird durch eine in großen Mengen im Schlangengift enthaltene spezifische Phosphomonoesterase, die 5'-Nucleotidase, verursacht. Die Reinigung der Phosphodiesterase besteht daher hauptsächlich in einer möglichst voll-

ständigen Trennung und Entfernung der 5'-Nucleotidase. HURST u. BUTLER (35) schlugen zur Trennung beider Enzyme eine chromatographische Methode vor. Sie gaben eine wäßrige Schlangengift-Suspension auf eine mit kleingeschnittenem Whatman No 5-Papier gefüllte Säule und eluierten anschließend mit Wasser, 0.1 % NaCl- und 1 % NaCl-Lösung. Die Hauptmenge an Phosphodiesterase befand sich im Eluat mit 0.1 % NaCl, während die 5'-Nucleotidase erst mit 1 % NaCl wieder eluiert wurde. Hydrolyseuntersuchungen mit der so gereinigten Phosphodiesterase an Oligonucleotiden lieferten aber noch beträchtliche Mengen an Nucleosiden.

SINSHEIMER u. KOERNER (36) benutzten zur Reinigung der Phosphodiesterase eine mehrmalige Acetonfällung. Die völlige Beseitigung der Nucleotidase-Aktivität wurde aber nur durch eine anschließende Hitze-Behandlung erreicht. Die Folge war, daß dabei auch 60 % der gewonnenen Phosphodiesterase inaktiviert wurden. Erst 1961 gelang es WILLIAMS et al. (37) die Acetonfällung so zu modifizieren, daß eine fast reine Phosphodiesterase in ausreichender Menge erhalten wurde. Nach der Acetonfällung führte er weitere Umfällungen mit Aethanol und eine kontinuierliche Papier-Elektrophorese durch. Auf diese Weise erhielt er ein völlig reines Enzym. Nach seinen Angaben mußten, um alle Schritte durchführen zu können, mindestens 20 g Schlangengift eingesetzt werden. Die große Menge an Schlangengift und der teilweise komplizierte apparative Aufbau standen uns nicht zur Verfügung. Wir versuchten daher, mit einfacheren Mitteln eine genügende Reinigung des Enzyms zu erreichen.

Für die Aufbereitung der Phosphodiesterase benutzten wir lyophilisiertes Schlangengift von *Crotalus atrox* (FIRMA Sigma). 2 g Schlangengift wurden in 200 ml Wasser 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wurde der Ansatz durch Whatman No 3 Papier filtriert. Das klare gelbe Filtrat wurde nun auf eine mit Cellulose MN 300 (Firma Macherey, Nagel u. Co.) gefüllte Säule von 16 cm Länge und 3 cm Durchmesser gegeben. Sobald die gesamte Flüssig-

keitsmenge in die Säule eingedrungen war, erfolgte die Elution mit 0.1 % NaCl-Lösung pH 7.0. Das Eluat wurde in 5 ml-Fractionen gesammelt und jeweils die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Fractionen mit meßbarer Extinktion wurden zusammengegeben. Wir erhielten ein Gesamtvolumen von 390 ml, das im Gefriertrockner auf 100 ml eingeengt wurde. Für die folgenden Acetonfällungen war es notwendig, das Natriumchlorid aus der Lösung zu entfernen. Dazu wurde 36 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die entsalzte Lösung wurde mit Wasser auf 120 ml aufgefüllt und im Eisbad mit 80 ml kaltem 0.5 M Acetattuffer pH 4.0 und 145 ml kaltem Aceton (-20°) versetzt. Die Mischung wurde im Eisbad 45 Minuten lang vorsichtig gerührt, wobei sich eine weiße Fällung bildete. Die Abtrennung des Präzipitates erfolgte durch Zentrifugieren bei 5000 Umdrehungen /Minute in einer Kältezentrifuge bei 0° . Der klare Überstand wurde dann 2 Stunden bei -17° gerührt und die entstandene Fällung bei -17° abzentrifugiert. Die Phosphodiesterase konnte nun aus dieser Lösung durch Zugabe von 55 ml Aceton (-20°) bei -17° ausgefällt werden. Die Fällung wurde in der Kälte zentrifugiert und in 20 ml Wasser bei Raumtemperatur gelöst. Nach Zentrifugieren dieser Lösung bei 2500 Umdrehungen/Minute und bei 0° wurde das Enzym daraus durch Gefriertrocknung erhalten. Die Ausbeute an Phosphodiesterase aus 2 g Schlangengift betrug 66 mg. Das lyophilisierte Enzym wurde im Tiefkühlschrank bei -20° aufbewahrt. Eine Lösung von 4 mg Enzym in 2ml destilliertem Wasser, bei -20° eingefroren, blieb über einen Zeitraum von mindestens 6 Wochen ohne Aktivitätsverlust stabil. Dieser Ansatz wurde als Enzym-Stammlösung für die folgenden Hydrolyseversuche genommen.

3.5.2. Bedingungen und Durchführung der enzymatischen Hydrolyse der DNA

Die Literaturangaben über die für eine Hydrolyse einzusetzen den Mengen an DNA, DNase I und Phosphodiesterase und über die Dauer der Behandlung variieren sehr stark. So wird DNA in einer Konzentration von 1 mg/ml bei DUNN u. SMITH (38) mit

0.5 $\mu\text{g/ml}$ DNase I 6 Stunden, bei SINSHEIMER u. KOERNER (36) mit 20 $\mu\text{g/ml}$ 48 Stunden und bei LITTLE u. BUTLER (39) mit 60 $\mu\text{g/ml}$ 8 Stunden hydrolysiert. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Verwendung der Phosphodiesterase. Wir haben daher in einigen Vorversuchen die benötigte Enzymmenge und die Inkubationszeit für eine Hydrolyse unter unseren Bedingungen festgelegt.

Die Spaltung der Nucleinsäure zu Oligonucleotiden und weiter zu Mononucleotiden ist mit einer Erhöhung des Extinktionskoeffizienten bei 260 nm verbunden. Auf diese Weise läßt sich der Verlauf der Hydrolyse durch Extinktionsmessung verfolgen. Um bei den folgenden Versuchen stets mit der gleichen DNA-Menge arbeiten zu können, wurde eine Stammlösung mit der Konzentration von 1mg/ml bereitet. Zu 2 ml dieser Stammlösung wurden 2ml des später beschriebenen Hydrolysemediums gegeben und die Mischung im Wasserbad bei 37° unter leichter Bewegung gehalten. Eine Vergleichslösung für die optische Messung enthielt statt der DNA-Stammlösung die gleiche Menge Wasser und wurde während des gesamten Versuches ebenso behandelt wie die Meßlösung. Nach Teilung der Versuchslösung in zwei 1.5 ml-Proben erfolgte aus dem Rest die Bestimmung der Extinktion vor der Hydrolyse. Dazu wurden jeweils 50 μl Versuchslösung mit 400 μl Wasser verdünnt und gegen eine entsprechende Verdünnung der Vergleichslösung bei 260 nm gemessen. Den einzelnen Mischungen wurden nun jeweils 150 μg DNase (Firma Worthington Biochem. Corp.) zugesetzt. Von dieser DNase-Menge konnte eine vollständige Hydrolyse erwartet werden. 5 Minuten nach der Enzymzugabe erfolgte die erste Extinktionsmessung unter Entnahme von 50 μl und Verdünnen mit 400 μl Wasser. Im Abstand von zuerst 5 Minuten, dann 10 Minuten und später nach jeweils 30 Minuten wurden weitere Messungen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Extinktion bei 260 nm stieg in der ersten Stunde sehr schnell an und erhöhte sich danach fast kontinuierlich. 5 Stunden nach der Enzymzugabe war der höchste Extinktionswert erreicht. Dieser änderte sich in den folgenden 5 Stunden nicht mehr. Unter den beschriebenen Bedingungen war die Extinktion gegen-

über der Messung vor der Hydrolyse um 46.5 % gestiegen. Dieser Wert stimmt gut mit den Ergebnissen von SINSHEIMER u. KOERNER (36) überein, die unter ähnlichen Versuchsbedingungen nach 48 Stunden einen Anstieg der Extinktion um 48 % beobachteten.

Der oben beschriebene Versuch wurde anschließend mit kleineren Mengen an DNase wiederholt. Dabei ergab sich bis zu einer zugegebenen Menge von 75 µg DNase keine Veränderung des Hydrolyseverlaufes. Dagegen führten 60 µg DNase nach 6 Stunden nur zu einer Extinktionserhöhung von 39 %. Für die erste Stufe der DNA-Hydrolyse waren damit die Bedingungen festgelegt. DNA in einer Konzentration von 1mg/ml wird in 5 Stunden bei 37° durch 100 µg/ml DNase vollständig gespalten.

Die erforderliche Inkubationszeit und Konzentration der Phosphodiesterase wurde nach der gleichen Methode bestimmt. Nach beendeter DNase-Hydrolyse wurde das Medium den Bedingungen der Phosphodiesterase angepaßt und die Extinktion bei 260 nm gemessen. Die Festlegung des maximalen Anstiegs der Extinktion erfolgte auch hier durch Zugabe einer hohen Konzentration an Phosphodiesterase (1mg/ml).

Zwischen 5 1/2 und 6 Stunden wurde der höchste Wert gemessen. Die Steigerung der Extinktion betrug 28.5 % gegenüber dem Wert vor Zugabe der Phosphodiesterase. SINSHEIMER u. KOERNER (36) geben 26 % nach 6 Stunden Hydrolyse an. Zur vollständigen Hydrolyse der Oligonucleotide zu Mononucleotiden wurde für eine DNA-Konzentration von 1 mg/ml eine Phosphodiesterase-Menge von 800 µg benötigt.

In der Abbildung 2 ist der Verlauf der DNA-Hydrolyse mit DNase und mit Phosphodiesterase als prozentualer Anstieg der Extinktion bei 260 nm während der Hydrolysedauer dargestellt.

Nachdem durch die Vorversuche die Bedingungen festgelegt waren, wurde die enzymatische DNA-Hydrolyse routinemäßig folgendermaßen durchgeführt: 500 µg DNA wurden in 0.45 ml einer 0.02 molaren NaCl-Lösung pH 7.0 während 4 Stunden bei 37° gelöst. Dieser Lösung wurden dann 50 µl aus einer DNase-

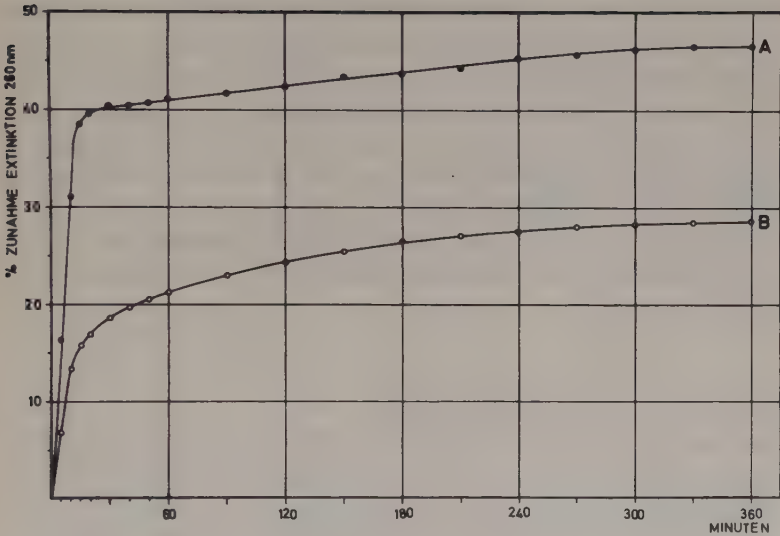


Abbildung 2

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anstieg der Extinktion bei 260 nm einer DNA-Lösung (500 µg/ml) A. während der Hydrolyse mit DNase I (50 µg/ml) bei pH 6.8 und 37° und B. nach Zugabe von Phosphodiesterase (400 µg/ml) zum ersten Hydrolysegemisch bei pH 9.0 und 37°.

Lösung von 1mg/ml, und 0.5 ml eines 0.3 molaren Acetat-Puffers pH 6.5, der außerdem noch 0.07 M Magnesiumacetat enthielt, hinzugefügt. Die Endkonzentrationen der Hydrolyse-mischung betrugen dann 500 µg DNA, 50 µg DNase, 10 mM NaCl und 35 mM Magnesiumacetat in einem Milliliter 0.15 M Acetat-Puffer pH 6.8. Nach 5 Stunden im Wasserbad bei 37° war die erste Stufe der Hydrolyse beendet. Der Lösung wurden nun 0.8 ml eines 0.25 molaren Ammonium-acetat-Puffers pH 9.2 und 0.2 ml der Phosphodiesterase-Stammlösung (2 mg/ml) zugegeben. Der pH-Wert betrug anschließend 9.0. Der Ansatz der zweiten Hydrolysestufe wurde dann weitere 6 Stunden unter leichter Bewegung im Wasserbad bei 37° gehalten. Sofort nach beendeter Hydrolyse wurde die Nucleotid-Mischung bis zu ihrer weiteren Behandlung im Tiefkühlschrank bei -20° eingefroren.

3.6 Trennung der DNA-Mononucleotide

Mehrere Methoden eignen sich zur Trennung von Mononucleotiden aus einem Gemisch. Ein sehr häufig angewandtes Verfahren ist die Säulenchromatographie an Kationenaustauschern, wie z.B. Dowex 50W (COHN 40) (SINSHEIMER u. KOERNER 41) (BUSCH 42), oder an Sephadex (BRAUN 43). Der Nachteil der Säulenchromatographie besteht darin, daß größere Mengen an Material zur Verfügung stehen müssen und die einzelnen Nucleotide in relativ großen Elutionsvolumina anfallen. Im Gegensatz zu den Ribonucleotiden sind die Deoxynucleotide sehr empfindlich gegen Säureeinwirkung. Besonders die Purin-Deoxynucleotide werden im Säuren leicht N-glykosidisch gespalten. So fand BUSCH (42) bei der Trennung von DNA-Nucleotiden am Kationenaustauscher und anschließender Elution mit 0.001 N HCl schon eine Spaltung bis zu 20 % der Purin-Deoxynucleotide.

Eine weitere Möglichkeit zur Nucleotid-Trennung stellt die Dünnschichtchromatographie an reiner Cellulose (RANDERATH 44), an DEAE- und ECTEOLA-Cellulose (RANDERATH 45) oder PEI-Cellulose (RANDERATH 46) dar. Diese Verfahren, wie auch die Papierchromatographie (VANDERHEIDEN 48), trennen meist nicht scharf

genug, um eine spätere quantitative Elution durchführen zu können. Daneben versagen diese Methoden bei der Abtrennung eventuell vorhandener Hydrolyseprodukte, wie z.B. Nucleoside oder Basen. Besonders bei der Hydrolyse mit Phosphodiesterase ist aber mit einer geringen Menge solcher Verunreinigungen in der Hydrolysemischung zu rechnen.

Eine sehr gute Trennung der DNA-Nucleotide kann durch Hochvolt-Papier-Elektrophorese erreicht werden (DAVIDSON u. SMELLI 49). Die ursprünglich zur Trennung von Ribonucleotiden verwendete Methode, kann unter bestimmten Bedingungen, wie später beschrieben wird, auch für Deoxynucleotide angewandt werden (SILVER et al. 50). Durch elektrophoretische Trennung kann vor allem eine quantitative Entfernung von Nucleosiden und Basen durchgeführt werden, da diese entgegengesetzt zu den Nucleotiden laufen. Eine saubere Trennung wird allerdings nur erreicht, wenn die aufgetragene Nucleotidmischung frei von anorganischen Ionen ist. Beim Auftragen der zu trennenden Mischung auf das Elektrophoresepapier werden darin vorhandene Salze auf dem Startfleck konzentriert. Während der Elektrophorese kommt es dadurch an dieser Stelle zu einer Veränderung des pH-Wertes des Laufmittels. Die Folge ist, daß die zur Trennung notwendige Ionenbildung der Komponenten durch das Laufmittel empfindlich gestört wird. Man erhält dann ein verschmiertes Chromatogramm, bei dem die Flecken starke Schwanzbildung zeigen.

Die Entsalzung der nach der Hydrolyse vorliegenden Nucleotidlösung stellte uns vor eine Reihe von Problemen. Die ersten Entsalzungsversuche erfolgten über einen Kationenaustauscher. Eine kleine Säule mit Dowex 50W-X4 (H^+) von 1.5 cm Länge und 0.6 cm Durchmesser wurde mit einer Nucleotidlösung beschickt und anschließend mit Wasser eluiert. Die Elektrophorese des Eluats zeigte eine sehr saubere Trennung. Die beiden Pyrimidin-Nucleotide (TMP und d-CMP) waren in guter Ausbeute vorhanden, wogegen die Purin-Nucleotide (dAMP und d-GMP) nur schwach auftraten. Die fehlende Menge wurde in Form ihrer Hydrolyseprodukte gefunden. Der Grund dafür war, daß nach dem Kationenaustausch die Anionen die Säule in Form ihrer entsprechenden Säuren verlassen. Beim Einengen des Eluats werden diese noch

konzentriert und führen zur Spaltung der gegen Säure empfindlichen Purin-Deoxynucleotide. Durch Verlängern der Säule war es zwar möglich, die Säure vor den Nucleotiden abzufangen. Die im Eluat aufgefundene Nucleotidmenge verringerte sich aber erheblich, da die Nucleotide an die Matrix des Austauschers teilweise adsorbiert werden und dann mit Wasser nicht mehr ausgewaschen werden können (COHN 51). Mehrere Versuche wurden unternommen, um eine Trennung des sauren Vorlaufs von der Nucleotidfraktion zu erreichen, ohne die Austauschsäule zu vergrößern. Dazu wurden unterschiedliche Mengen verschiedener Chromatographiermittel, wie Cellulose, Kieselgel und Talcum, unter den Dowex-Kationenaustauscher gelegt. Zwar gelang es, besonders bei der Verwendung von Kieselgel, die Spaltung der Purin-Deoxynucleotide zurückzudrängen, aber hinsichtlich der Ausbeute an Nucleotiden waren alle Verfahren nicht befriedigend. Die besten Ergebnisse unter Verwendung eines Kationenaustauschers wurden mit einer für Ribonucleotide entwickelten Säule nach EAST (52) aus Dowex 50W-X4 und darunter eine kleine Schicht aus Sephadex G-10 erzielt. (Tabelle 3).

Ein Entsalzungsverfahren über eine Säule mit Chromatographierkohle (Norit A) wurde von AMBELLAN (53) beschrieben. CABIB et al. (54) verwendeten eine solche Säule zum Konzentrieren der großen Elutionsvolumina nach der Nucleotid-Trennung auf Austauschersäulen. Die Nucleotide sollen dabei an die Kohle absorbiert werden (). Durch Waschen mit Wasser erfolgt die Entfernung der Salze, wobei die Nucleotide in der Säule verbleiben. Diese können dann anschließend mit einer Ammoniak-Aethanol-Wasser-Mischung eluiert werden.

Zur Prüfung der einzelnen Säulen wurde von uns eine aus Reinstoffen (Firma Boehringer) bereitete Nucleotidmischung mit gleicher Ionenkonzentration wie in der Hydrolyselösung verwendet. Die Nucleotidlösung ohne Salzzugabe wurde elektrophoretisch getrennt und die dabei erhaltenen Einzelmengen jeweils gleich 100 % Ausbeute gesetzt. In der Tabelle 3 sind die für jede verwendete Säule gefundenen Nucleotidausbeuten und ein Auftreten von Hydrolyseprodukten angegeben. Danach

Art der Säule	Säulenlänge (cm)	Nucleotidausbeute in %				Hydrolyseanteil
		d-TMP	d-CMP	d-AMP	d-GMP	
Dowex 50W-X4	1.5	86	81	14	21	+++
Dowex 50W-X4	5.0	62	45	44	32	+
Dowex 50W-X4	1.0	55	38	41	39	++
Cellulose MN 300	1.0					
Dowex 50W-X4	1.0	57	38	37	42	++
Talcum Merck	1.0					
Dowex 50W-X4	1.0	59	53	54	57	
Kieselgel Merck	1.0					
Dowex 50W-X4	1.0	71	73	67	63	+
Sephadex G-10	0.8					
Norit A + Cellulose MN 300(1:)	1.0	85	83	82	78	

Tabelle 3

Die Tabelle zeigt einige von uns zur Entsalzung der Nucleotidlösung nach DNA-Hydrolyse verwendete Säulen ($\emptyset = 0.6$ cm). Die angegebene Ausbeute stellt die nach Entsalzung gefundene Nucleotidmenge in Prozent dar, gegenüber Werten, die nach Trennung gleicher Konzentrationen ohne Entsalzung gefunden wurden. Die Angabe des Hydrolyseanteils bezieht sich auf Flecken, die bei der Elektrophorese entgegengesetzt zu den Nucleotiden gelaufen waren. Die Beurteilung erfolgte dabei nach der Intensität der Flecken unter der UV-Lampe.

werden die besten Ergebnisse mit einer Norit-A-Säule erzielt.

Nach dem Auftauen der enzymatisch aus DNA bereiteten Nucleotid-Mischung wurde das aus den Enzymen stammende Protein durch Schütteln mit Chloroform-Isoamylalkohol denaturiert und entfernt. Eine Säule von 1 cm Länge und 0.6 cm Durchmesser eines Gemisches aus gleichen Teilen Norit A und Cellulose MN 300 wurde mit 50 ml Wasser gewaschen. Die alkalische Nucleotid-Mischung wurde mit 0.1 N HCl neutralisiert und mit einer Elutionspumpe auf die Säule gegeben. Die Entfernung der Salze erfolgte durch Waschen mit 25 ml Wasser. Danach wurden die Nucleotide mit einer Mischung aus 1 ml konzentrierter Ammoniaklösung und 40 ml Aethanol (98%), die mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt wurde, eluiert. Mit Hilfe einer Durchflußküvette und angeschlossenem Schreiber kann der Vorgang auf der Säule gut verfolgt werden. Ein typisches Elutionsprofil bei 254 nm zeigt die Abbildung 3. Daraus geht hervor, daß die Nucleotide quantitativ in der Säule verbleiben und mit Wasser nicht eluierbar sind. Mit etwa 7 ml ammoniakalischer Aethanollösung können sie dann aus der Säule befreit werden.

In einem Vakuumexsiccator über festem KOH wurde nun das Nucleotideluat teilweise von Aethanol und Ammoniak befreit. Die vollständige Entfernung des Lösungsmittels erfolgte anschließend durch Gefriertrocknung über Nacht. Die so erhaltenen Nucleotide wurden in 0.15 ml 0.005 molarem Citratpuffer pH 3.4 gelöst. Jeweils 50 µl dieser Lösung wurden in einem 3 cm langen und 2 mm breiten Streifen auf Elektrophoresepapier (Firma Schleicher & Schüll No 2043 b) aufgetragen. Die Nucleotidtrennung erfolgte in einer Camag-Elektrophorese-Apparatur bei 5000V in einem 0.05 molaren Citratpuffer pH 3.4. Ein Kühlaggregat mit Umlaufpumpe verhinderte eine Überhitzung des Gerätes und sicherte eine Arbeitstemperatur von 1-3°. Die Laufzeit betrug zwischen 14-16 Minuten, wobei die Stromstärke von anfangs 25 mA auf 40 mA stieg. Besonders scharfe Trennungen wurden erzielt, wenn am Anfang eine kurze Zeit mit 500-1000 V und erst dann mit der maximalen Leistung von 5000 V gearbeitet wurde. Das Chromatogramm wurde bei Raumtemperatur getrocknet und die einzelnen Flecken unter der UV-Lampe lokalisiert und markiert.

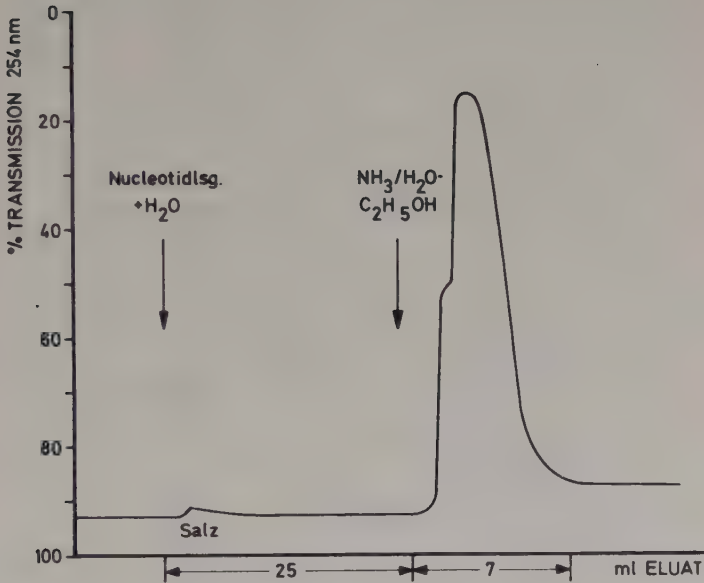


Abbildung 3

Die Abbildung zeigt den Verlauf der Entsalzung und anschließenden Elution der Nucleotidlösung nach enzymatischer Hydrolyse. Als Säule wurde Norit A und Cellulose MN 300 (1:1) 1.0 x 0.6 cm verwendet. Nach Entfernung der Salze durch Waschen mit 25 ml Wasser erfolgte die Elution der Nucleotide mit 7 ml NH₃-H₂O-Aethanol (1 ml konz. NH₃-Lsg. + 40 ml Aethanol mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt). Zur Messung wurde eine Durchflußküvette (254 nm) mit LKB Uvicord II Schreiber verwendet.

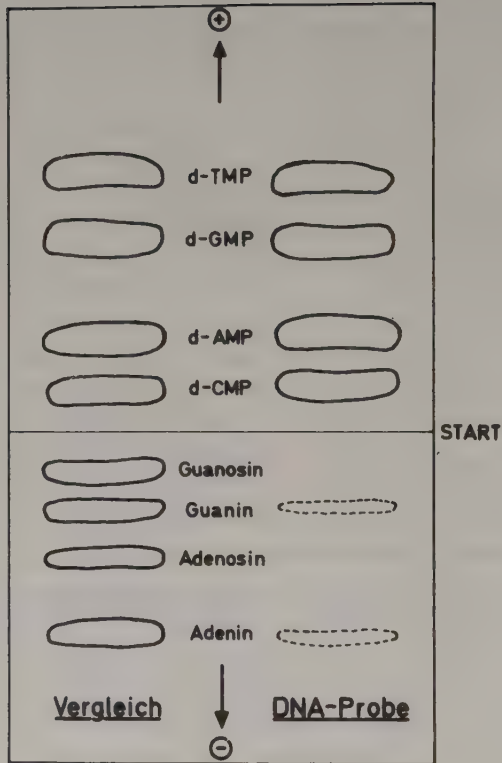


Abbildung 4

Die Abbildung zeigt die elektrophoretische Trennung der Mononucleotide nach enzymatischer Hydrolyse. Zum Vergleich wurden Reinsubstanzen der Mononucleotide, Purin-Deoxynucleoside und Purinbasen mit aufgetragen. Die Trennung erfolgte in 0.05 Citronensäure-Citratpuffer pH 3.4 während der ersten Minute bei 500 V und anschließend 14 Minuten bei 5000 V. Bei diesem pH-Wert verhalten sich die Mononucleotide wie Anionen, die Nucleoside und Basen wie Kationen. Die DNA-Nucleotidmischung zeigte regelmäßig sehr schwache Flecken (gestrichelt) auf der Höhe von Guanin und Adenin.

3.7. Hydrolyse und Trennung der DNA-Basen

Eine Freisetzung der Basen aus Nucleinsäuren ist am einfachsten durch Säurehydrolyse erreichbar. Eine vollständige Hydrolyse ohne chemische Veränderungen an den Basen ist aber von der Wahl der Säure abhängig. Die Einwirkung von 0.1 N HCl bei 100° auf DNA führt zu einer quantitativen Freisetzung der Purinbasen. Um auch die Pyrimidine als freie Basen zu erhalten, sind höhere HCl-Konzentrationen oder Hydrolysetemperaturen erforderlich. Unter diesen drastischen Bedingungen kommt es aber zur partiellen Desaminierung der Purine (ABRAMS 55). Die Verwendung von konzentrierter Ameisensäure zur Basenhydrolyse wurde von VISCHER u. CHARGAFF (56) beschrieben. Sie fanden eine quantitative Hydrolyse der DNA zu Basen nach zweistündiger Behandlung mit 98-prozentiger Ameisensäure bei 175° in einem zugeschmolzenen Glasrohr (Bombenrohr). MARSHAK u. VOGEL (57) kamen zu etwa gleichen Ergebnissen unter Verwendung von 7.5 n Perchlorsäure nach 1 Stunde bei 100°. In vergleichenden Untersuchungen an RNA und DNA wurde von WYATT (58) festgestellt, daß die Behandlung der DNA sowohl mit Ameisensäure, als auch mit Perchlorsäure, zu keinen signifikanten Basenveränderungen führt. Für die quantitative Freisetzung der Basen mit konzentrierter Ameisensäure ist für die RNA eine Behandlungszeit von 2 Stunden erforderlich. Die DNA dagegen ist unter gleichen Bedingungen schon nach 45 Minuten vollständig hydrolysiert (WYATT u. COHEN 59). Zur Trennung der Basen nach der Hydrolyse muß beim Perchlorsäure-Verfahren die Säure durch Fällern als Kaliumperchlorat entfernt werden. Dabei wird ein Teil der Basen durch Adsorption an Kaliumperchlorat mitgefällt. Dieses Problem taucht bei der Behandlung mit Ameisensäure nicht auf, da hier die Säure wegen ihrer Flüchtigkeit leicht abgezogen werden kann.

Für unsere DNA-Hydrolyse wählten wir das Verfahren mit konzentrierter Ameisensäure. Dabei wurden etwa 500 µg getrocknete DNA in 0.5 ml 98-prozentiger Ameisensäure 1 Stunde im Bombenrohr auf 175° erhitzt. Durch den hohen inneren Druck kommt es beim Öffnen leicht zum Zerplatzen des Bombenrohrs.

Zur Verminderung des Drucks wurde das Rohr daher erst im Tiefkühlschrank abgekühlt und anschließend kurz in flüssigen Stickstoff gehalten. Mit der Spitze einer kleinen Flamme wurde dann das Glas an der ausgezogenen Kapillare geschmolzen und das Bombenrohr durch den inneren Druck geöffnet. Die Lösung wurde im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt und der Rückstand dann in 0.15 ml 0.1 N HCL gelöst.

Die Trennung der Basen aus der salzsauren Lösung erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie auf Cellulose-Platten (Firma Merck). Dazu wurden 50 µl der Basenlösung in einem 4 cm langen und 2 mm breiten Streifen auf die Platte aufgetragen. Als Laufmittel verwendeten wir ein Gemisch aus Methanol - konz. HCl - Wasser (65 : 17 : 18 V/V) nach KECK u. HAGEN (60). Nach etwa 3 1/2 Stunden waren bei einer Laufstrecke von 12 cm die Basen gut getrennt.

Durch Remissionsmessung mit einem Chromatogramm-Spektral-photometer (Firma Zeiss, PMQ II) bei 260 nm kann die Lage der einzelnen Flecken auf der DC-Platte sehr genau bestimmt werden. Gleichzeitig ermöglicht dieses Verfahren die Feststellung der vollständigen Trennung der Substanzen. Die Möglichkeit mit Hilfe dieser Messungen eine quantitative Bestimmung der Flecken direkt auf der DC-Platte zu erreichen, wurde lange Zeit von uns versucht. Bisher war es uns aber nicht möglich, in einem Bereich von 10-20 µg Basen pro Fleck eine hinreichend genaue Mengenbestimmung zu erhalten.

Die Abbildung 5 zeigt eine bei 260 nm geschriebene Remissionskurve der Basen nach DC-Trennung. Dabei ist ein deutlicher Anstieg der Basislinie vom Startpunkt zur Front hin zu erkennen. Die Linie unter der Basenkurve auf der Abbildung stellt die Remissionsmessung unter gleichen Bedingungen einer Vergleichsfläche desselben Chromatogramms dar. Sie verläuft im Anstieg genau wie die Grundlinie der Basenkurve. Die Zunahme der Absorption wird offenbar durch Hydrolyseprodukte aus der Cellulose verursacht, die bei der Einwirkung des stark salzsauren Laufmittels entstehen. Diese Erscheinung macht es unbedingt erforderlich, auf jeder Platte neben dem Basenfleck eine gleichgroße Stelle freizulassen, die später zur quantitativen Bestimmung als Vergleich verwendet wird.

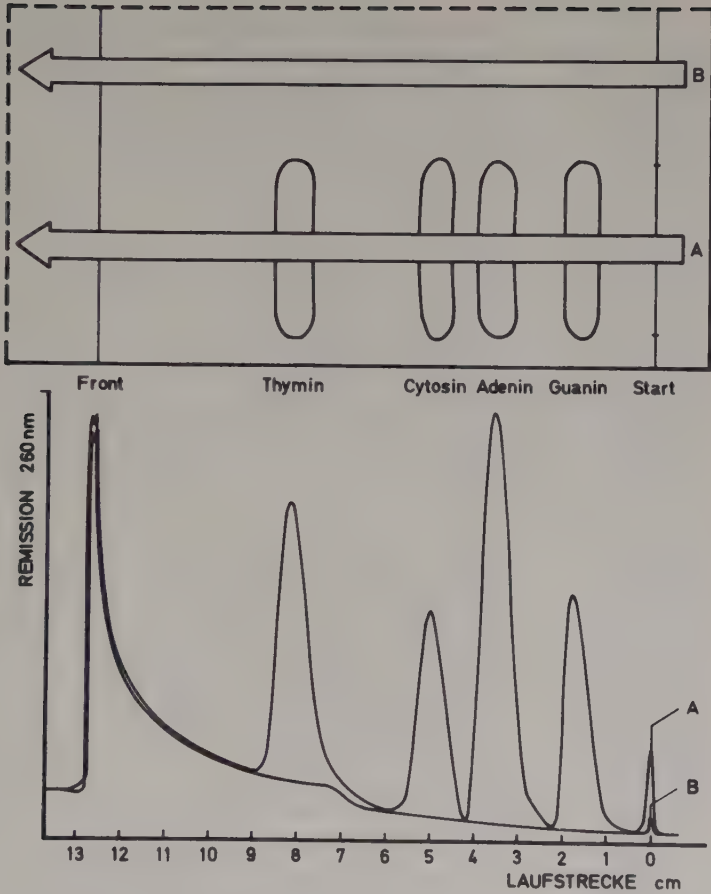


Abbildung 5

Die Abbildung zeigt die Trennung der DNA-Basen durch Dünnschicht-Chromatographie. Im oberen Teil der Abbildung ist ein Ausschnitt aus einer DC-Platte mit den Basenflecken, wie sie unter der UV-Lampe erscheinen, dargestellt. Entsprechend den Pfeilen A und B wurden die Remissionsspektren bei 260 nm aufgenommen.

3.8. Identität und quantitative Bestimmung der Mononucleotide und Basen

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Deoxymononucleotide und Basen kann die für jede dieser Substanzen charakteristische Absorption im UV-Bereich herangezogen werden. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Lage und Intensität der UV-Banden stark durch den pH-Wert der Meßlösung beeinflußt wird. Im allgemeinen wirkt sich eine Ionisierung der NH_2 -Gruppe oder $-\text{NH}-\text{CO}$ -Gruppe dieser Verbindungen in einer bathochromen Verschiebung und Extinktionssteigerung aus. Eine zuverlässige quantitative Bestimmung ist nur möglich, wenn der zu bestimmende Stoff ausschließlich in einer Form, ionisch oder neutral, in der Lösung vorliegt (BEAVEN, HOLIDAY u. JOHNSON 61). Wegen der Säureempfindlichkeit der Deoxynucleotide wählten wir für diese einen pH-Wert um 7. Die Messung der Basen erfolgte bei pH 1-2, da diese im Sauren besser löslich sind.

Zum Eluieren der Mononucleotide wurden die markierten Flecken aus dem Elektrophoresepapier ausgeschnitten und mit einer Schere in kleine Stücke zerteilt. Als Vergleich verwendeten wir Teile des gleichen Elektroferogramms auf der Höhe der entsprechenden Substanzflecken. Unter Schütteln bei 37° in Eppendorf-Gefäßen wurde jeweils viermal mit 0.2 ml Phosphat-Puffer pH 7.0 eluiert. Das Eluieren der Basen und der entsprechenden Referenzen erfolgte nach Auskratzen der Cellulose aus der DC-Platte mit vier mal 0.2 ml 0.1 N HCl bei 65° . Die Eluate der einzelnen Nucleotide und Basen wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und bis zur völligen Klarheit zentrifugiert. Zur Identifizierung wurden anfangs die UV-Spektren der Substanzen mit einem Unicam SP 1800-Photometer in Halbmikroküvetten (0.5 ml) bei 1 cm Schichtdicke aufgenommen. VOLKIN u. COHN (62) zeigten, daß die Verhältniszahlen der Extinktionswerte bei verschiedenen Wellenlängen und definierten pH-Werten gut zur Identifizierung geeignet sind. Auf diese Weise läßt sich bei Routineuntersuchungen das Aufnehmen ganzer Spektren ersparen.

Substanz	pH	250/260 nm		280/260 nm		290/260 nm	
			Lit.		Lit.		Lit.
d-TMP	7	0.645 $\pm$ 0.005	0.650	0.733 $\pm$ 0.009	0.730	0.236 $\pm$ 0.003	0.240
d-CMP	7	0.831 $\pm$ 0.009	0.820	1.000 $\pm$ 0.005	0.990	0.296 $\pm$ 0.002	0.300
d-AMP	7	0.802 $\pm$ 0.006	0.800	0.150 $\pm$ 0.004	0.140	0.020 $\pm$ 0.005	0.010
d-GMP	7	1.092 $\pm$ 0.010	1.130	0.678 $\pm$ 0.006	0.670	0.276 $\pm$ 0.004	0.270
Thymin	2	0.678 $\pm$ 0.006	0.670	0.529 $\pm$ 0.001	0.530	0.097 $\pm$ 0.003	0.090
Cytosin	2	0.485 $\pm$ 0.005	0.480	1.510 $\pm$ 0.013	1.530	0.778 $\pm$ 0.006	0.780
Adenin	2	0.769 $\pm$ 0.004	0.760	0.373 $\pm$ 0.002	0.375	0.038 $\pm$ 0.001	0.035
Guanin	2	1.365 $\pm$ 0.005	1.370	0.827 $\pm$ 0.014	0.840	0.494 $\pm$ 0.005	0.500

Tabelle 4

Die Tabelle zeigt die errechneten Verhältnisse aus der Extinktionsmessung bei 250, 260, 280 und 290 nm für die einzelnen Nucleotide und Basen nach Trennung und anschließendem Eluieren. Zum Vergleich sind die in der Literatur (62) angegebenen Verhältnisse gegenübergestellt. Die von uns gefundenen Verhältnisse stellen Mittelwerte aus 17 Bestimmungen dar.

Wir haben später für die einzelnen Substanzen die Extinktionswerte bei 250, 260, 280 und 290 nm in einem Zeiss-Photometer gemessen. In der Tabelle 4 werden die von uns gefundenen Extinktionsverhältnisse mit Angaben aus der Literatur (62) verglichen.

Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Berechnung aus den Extinktionswerten bei 260 nm unter Verwendung der bekannten molaren Extinktionskoeffizienten (61).

3.9. Feststellung der Verteilung der Radioaktivität auf die embryonalen Zellkomponenten

Die detaillierte Untersuchung der Bausteine einer Nucleinsäure nach der oben beschriebenen Methode ist relativ aufwendig. Um schnell Informationen über einen Versuch zu erhalten, wurde daher das schon früher erwähnte "Screening"-Verfahren als Kontrolle verwendet. Mit dieser von KROWKE (63) auf embryonales Gewebe angepassten Methode gelingt es, die einzelnen Zellkomponenten des Embryos voneinander zu trennen. Dafür erfolgt zuerst eine Extraktion der Embryonen mit kalter Perchlorsäure. Man erhält eine säurelösliche und eine säureunlösliche Fraktion. Aus der säureunlöslichen Fraktion werden dann durch Waschen mit Alkohol-Aether die Lipide herausgelöst. Nach einer RNase-Behandlung lassen sich die nun säurelöslichen RNA-Bestandteile fraktionieren. Aus dem Rückstand wird durch Extraktion mit heißer Perchlorsäure die DNA-Fraktion gewonnen. Die Proteine erhält man nach allen Waschungen als letzte Komponente. Die Radioaktivität der einzelnen Zellkomponenten wird gemessen. Man erhält so in relativ kurzer Zeit ein recht genaues Verteilungsmuster der Radioaktivität im Embryo.

Neben einer Kontrolle der in-vivo-Versuche eignet sich diese Methode sehr gut zur orientierenden Feststellung von Pharmakaeinflüssen auf die Nucleinsäuresynthese beim Embryo. So wurden eine Reihe von Pharmaka auf ihren Einfluß auf den embryonalen Stoffwechsel mit der "Screening"-Methode untersucht (KROWKE et al. 64). War eine Wirkung in dieser Richtung erkennbar, so folgte unter Anwendung der gleichen Methode die Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung des Pharmakons. Erst

dann erfolgte eine genauere Analyse der Wirkung auf den DNA-Stoffwechsel, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wird.

3.10. Messung der Radioaktivität

Für die Messung der Radioaktivität wurde ein Flüssigkeits-Szintillations-Zähler der Firma Packard, Modell 3380, verwendet. Das Gerät war zur Messung von doppeltmarkierten Proben (^{32}P und ^{14}C) eingestellt. Unter diesen Bedingungen wird ein gewisser Anteil von ^{32}P im ^{14}C -Kanal mitgezählt. Die Zählhausbeute ist abhängig von der Größe des Quench-Wertes (Löschgrad) einer Probe. Mit Hilfe von Standardproben wurde für jedes zu zählende Isotop die Zählhausbeute bei verschiedenen Quenchwerten bestimmt. In gleicher Art wurde der Anteil von ^{32}P im ^{14}C -Kanal ermittelt. Die absolute Aktivität in dpm (Zerfälle/Minute) erhält man durch Korrektur der vom Gerät gelieferten Meßwerte mit den entsprechenden Werten aus den erstellten Eichkurven. Zur Erleichterung der Rechenoperationen benutzten wir einen Digital-Rechner der Firma Wang, Modell 370, mit einem Lochkarten-Programm. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte bei kleinen Flüssigkeitsmengen (bis 0.3 ml) in einem Toluol-Zählgemisch (8 g PPO + 100 mg POPOP in 3 l Toluol). Größere Volumina, wie z.B. bei den Nucleotid- und Basenelementen (0.6-0.8 ml) mischen sich nur schlecht mit diesem Szintillations-Gemisch. Die Folge ist ein stark gequenchtes Medium, und damit verbunden, eine reduzierte Zählhausbeute. In diesen Fällen benutzten wir Instagel^R der Firma Packard als Zählgemisch.

3.11. Zusammenfassung der Methode

1.

Rattenembryonen am Tage 12 der Schwangerschaft werden schnell herauspräpariert. Durch Zentrifugieren des Homogenats in Saccharose erfolgt die Trennung in cytoplasmatische Anteile und Kerne. Die Kernfraktion wird weiter nach dem Citronensäure-Verfahren hochgereinigt.

2.

Die Isolierung der DNA wird durch Extrahieren der Kerne mit Phenol und anschließend Chloroform-Isoamylalkohol durchgeführt. Noch vorhandene RNA wird durch RNase entfernt. Für die so erhaltene DNA konnte die weitgehende Abwesenheit von RNA, Glucosaminoglycane und Protein nachgewiesen werden.

3.

Eine Methode zur Reinigung von Phosphodiesterase aus Schlangengift über Säulenchromatographie und Acetonfällungen wird beschrieben. Die Bedingungen für eine enzymatische Hydrolyse mit DNase I und Phosphodiesterase werden festgelegt.

4.

Die Entsalzung und Reinigung des nach der enzymatischen Hydrolyse erhaltenen Nucleotidgemischs wird mit einer Norit-A-Cellulose-Säule durchgeführt. Die Trennung der Mononucleotide erfolgt durch Hochvolt-Papier-Elektrophorese.

5.

Mit konzentrierter Ameisensäure wird die DNA zu Basen hydrolysiert. Ihre Trennung erfolgt durch Dünnschicht-Chromatographie auf Cellulose.

6.

Zur Bestimmung der Identität, Reinheit und Quantität der einzelnen eluierten Mononucleotide und Basen werden die Absorptionsspektren aufgenommen oder die Extinktionen bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt und ihre Verhältnisse zueinander errechnet. Die Messung der spezifischen Aktivitäten erfolgt direkt aus den photometrisch bestimmten Eluaten.

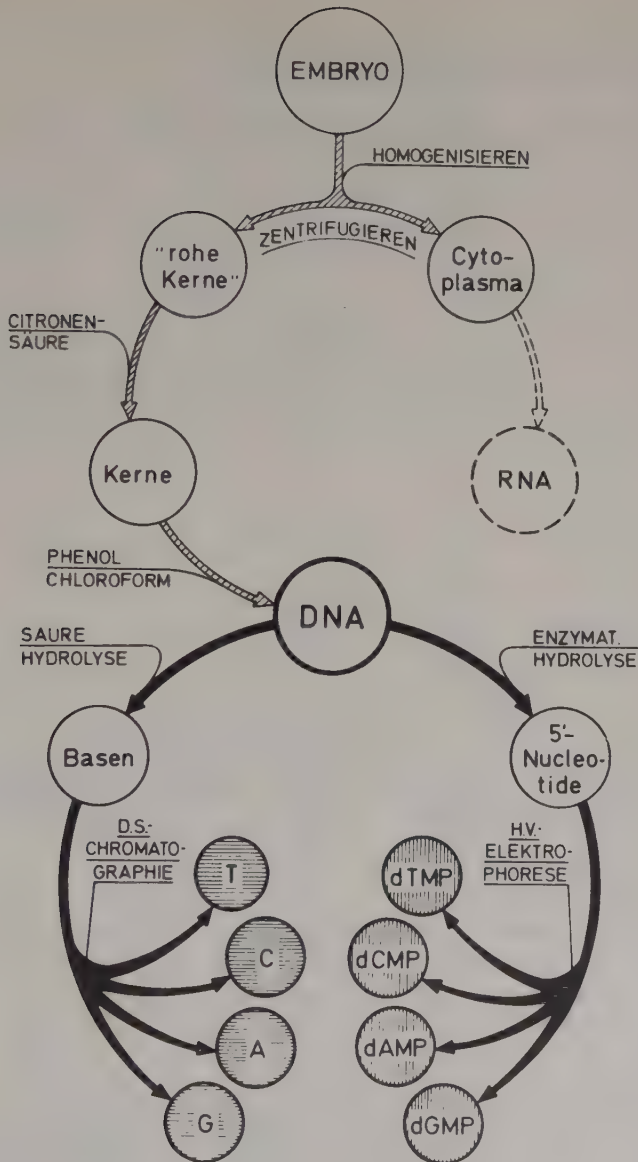


Abbildung 6

Schema der Methode

4. Versuche über die radioaktive Markierbarkeit der Kern-DNA und ihrer Bausteine in-vivo

4.1. ^{14}C -Glucose und ^{32}P -Phosphat als Precursoren

Mit Hilfe von radioaktiv markierten Vorstufen ist es möglich, den Verlauf von Stoffwechselvorgängen zu verfolgen. Eine angebotene Vorstufe kann bei der Nucleinsäuresynthese entweder selbst ("spezifischer" Precursor) oder in Form von entstandenen Folgeprodukten ("unspezifischer" Precursor) eingebaut werden. Für unsere Problemstellung kamen nur Vorstufen in Frage, die eine Markierung der einzelnen Bausteine der Nucleinsäure erlaubten. Außerdem mußten die markierten Substanzen den Embryo als Ort der Synthese in ausreichender Menge erreichen.

In-vitro-Untersuchungen an verschiedenen Geweben zeigten, daß ^{14}C -Glucose zu einer Markierung der Pentosen in den Nucleinsäuren führt (ITZAKI 65) (COFFEY 66). Die Bildung der für die Biosynthese der Nucleinsäuren erforderliche Ribose erfolgt bei Säugetieren fast vollständig aus Glucose über den Pentosephosphat-Weg (HIATT u. LAREAU 67). Erst nach der Synthese der Ribonucleotide wird sekundär die Ribose zur Deoxyribose reduziert unter Bildung der Deoxyribonucleotide (Abbildung 7). Die Glucose bildet daher den Grundbaustein der Pentoseanteile beider Nucleinsäuren.

Zur de-novo-Synthese der Purinbasen bzw. der Pyrimidinbasen werden vom Organismus als Vorstufen Glycin, Formiat, Carbonat, Carbamylphosphat und Asparaginsäure benötigt. Alle diese Vorstufen stellen gleichzeitig Metaboliten der Glucose dar. Die Möglichkeit, auch die Basen der Nucleinsäuren zu markieren, bot sich hier unter Verwendung von Glucose als Precursor an.

Phosphorylierungsreaktionen sind wie bei vielen anderen physiologischen Vorgängen auch bei der Nucleinsäuresynthese von großer Bedeutung. Die Synthese der Nucleinsäuren erfolgt aus den Trinucleotiden unter Abspaltung eines Moleküls Pyrophosphat. Das in der Nucleinsäure vorliegende und nach der Hydrolyse zu Mononucleotiden erhaltene Phosphat ist daher

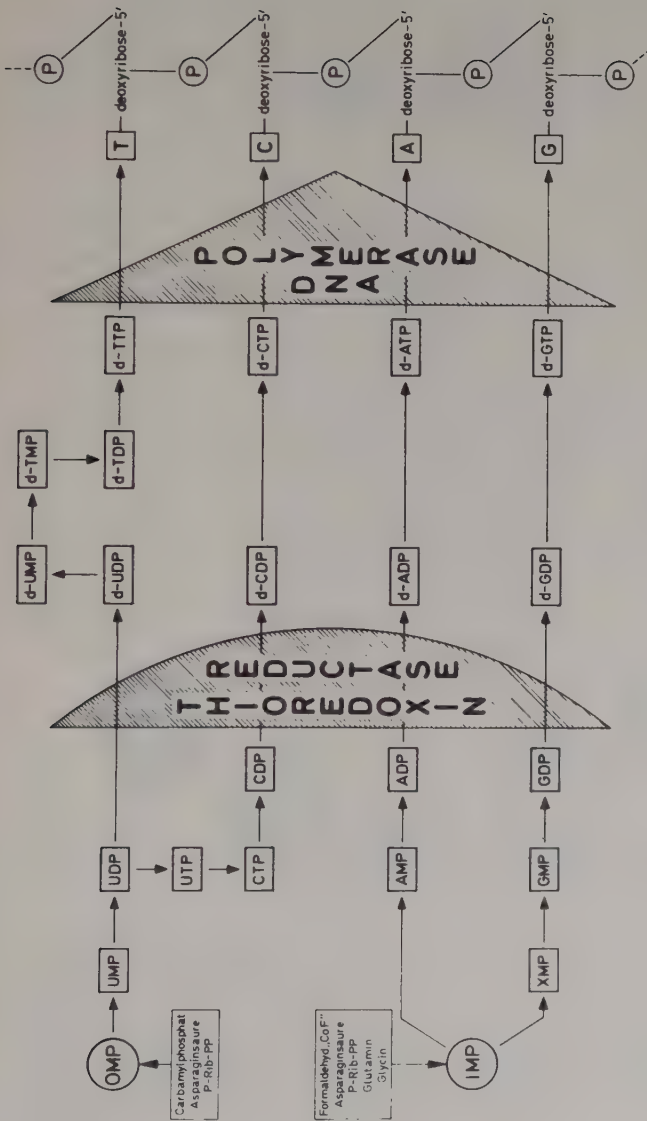


Abbildung 7

Schema der de-novo-Synthese von Deoxyribonucleotiden aus Ribonucleotiden und Bildung eines DNA-Moleküls.

stets das α -ständige der Trinucleotide. Im Falle einer de-novo-Synthese erfolgt der Einbau des α -P-Atoms über 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (P-R-PP). Bei der Biosynthese der Purine wird P-R-PP schon mit zur Bildung des Purinrings verwendet, also in einem sehr frühen Stadium, wogegen bei den Pyrimidinen erst Orotsäure aufgebaut wird, die dann durch P-R-PP in das Mononucleotid (OMP) überführt wird. Das 5'-P-Atom im P-R-PP wird über ATP in das Molekül eingeführt. Eine Markierung ist nur möglich, wenn das anorganische, zugeführte, ^{32}P -Atom α -ständig auf ATP übertragen wird. Dafür kommt entweder die oxydative Phosphorylierung oder der Vorgang der Glycolyse in Frage.

In Geweben, bei denen eine Synthese von Nucleinsäuren nur sehr langsam erfolgt, kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen Abbau und Neubildung der Nucleinsäuren. Der Zerfall der Nucleinsäurekomponenten läßt Nucleoside und Basen wieder entstehen. Diese werden dann wieder zur Synthese neuer Nucleinsäuren verwendet. Im Falle der Nucleoside erfolgt eine Phosphorylierung mit Hilfe von ATP, bei den Basen wird P-R-PP zur Nucleotidbildung verwendet. Die Verwendung schon vorhandener Bausteine der Purin- bzw. Pyrimidinstruktur zur Synthese von Nucleinsäuren wird als "salvage-pathway" bezeichnet. Letztlich stammt eine ^{32}P -Markierung in den Nucleinsäuren, ob de-novo oder nach dem salvage-pathway aufgebaut, immer aus einem α -ständigen P-Atom des ATP.

4.2. Einbau der radioaktiven Vorstufen in einige Zellbestandteile des Embryos

KROWKE et al. (68) führten in-vivo Untersuchungen an Rattenembryonen mit ^{14}C -Glucose und ^{32}P -Orthophosphat durch. Die Trennung der Zellkomponenten des Embryos erfolgte dabei nach der schon beschriebenen Screening-Methode. Beide unspezifischen Precursoren gingen in der Zeit von Tag 11 bis 15 der Schwangerschaft gut auf den Embryo über. Es konnte gezeigt werden, daß ein Einbau der Radioaktivität in alle säureunlöslichen Zellkomponenten des Embryos erfolgt (Abbildung 8).

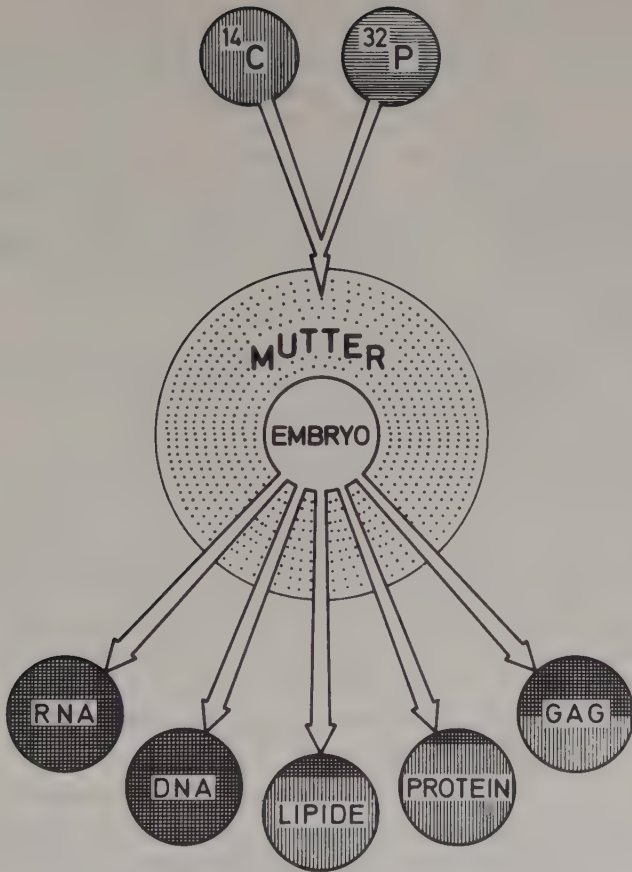


Abbildung 8

Einbau der Radioaktivität in die säureunlöslichen Zellkomponenten des Embryos nach in-vivo Behandlung mit ^{14}C -Glucose und ^{32}P .

Beide Precursoren stellen physiologische Vorstufen dar. Bei einer intravenösen Injektion von 1 mCi/kg uniform markierter Glucose und 3 mCi/kg ^{32}P -Orthophosphat (trägerfrei) wird die physiologische Konzentration an beiden Stoffen nur unwesentlich erhöht. Die Konzentrationserhöhung im Ratten Serum liegt bei Glucose unter 5 %, bei Phosphat ist sie praktisch nicht meßbar. Ein Nachteil bei der Verwendung von ^{32}P liegt in der kurzen physikalischen Halbwertszeit von 14.3 Tagen. Das bedeutet bei der zeitlich recht aufwendigen Methode zur Trennung der einzelnen DNA-Bausteine ein sehr schnelles Arbeiten, um noch meßbare Markierungen zu haben. Da ^{32}P gegenüber ^{14}C ein stärkerer β -Strahler ist, kann auch keine größere Menge an markiertem Phosphat gegeben werden, ohne daß bei den Versuchstieren mit Strahlenschäden gerechnet werden muß. Aus diesem Grund haben wir spätere Versuche sogar mit kleineren Mengen an ^{32}P (1 mCi/kg) durchgeführt.

Detaillierte Untersuchungen an hochgereinigter ribosomaler RNA aus Rattenembryonen nach in-vivo-Behandlung mit markierter Glucose bewiesen, daß auch die RNA-Basen unter diesen Bedingungen eine meßbare Markierung erhalten (MEWES 1). Da die zur Biosynthese der DNA benötigten Deoxynucleotide durch Reduktion der Ribose aus den Ribonucleotiden gebildet werden (Abbildung 7), konnte auch mit einer Basenmarkierung in der DNA gerechnet werden. Voraussetzung ist allerdings, daß die DNA im Embryo hauptsächlich nach dem Schema der de-novo-Synthese gebildet wird.

Die zeitliche Abhängigkeit des Einbaues der markierten Vorstufen in die Kern-DNA bei Doppelmarkierung ist in der Abbildung 9 wiedergegeben (KROWKE 68). Die Tiere erhielten dabei mit einer einmaligen intravenösen Injektion je 1 mCi/kg ^{14}C -Glucose und ^{32}P . Die Embryonen wurden dann entsprechend den in der Abbildung 9 angegebenen Zeiten nach der Injektion mit Hilfe der Screening-Methode aufgearbeitet. Schon eine halbe Stunde nach der Injektion läßt sich eine ^{14}C -Markierung in der DNA nachweisen. Bis drei Stunden steigt die spezifische Aktivität für ^{14}C weiter an und bleibt bis 5 Stunden nach der Injektion auf diesem Wert stehen. Die Kinetik des Einbaues von ^{32}P unterscheidet sich deutlich von der

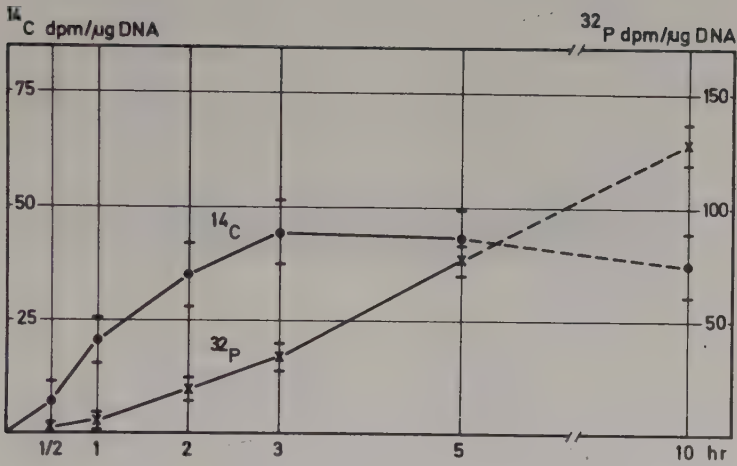


Abbildung 9

Die Abbildung zeigt die zeitliche Abhängigkeit des Einbaus von ^{14}C und ^{32}P in die Kern-DNA von Embryonen am Tage 12 der Schwangerschaft nach Injektion von je 1mCi/kg ^{14}C -Glucose und ^{32}P . Die Aufarbeitung erfolgte nach der Screening-Methode.

(aus KROWKE et al. 68).

des ^{14}C -Einbaues. Es erfolgt ein fast linearer Anstieg der spezifischen Aktivität in der DNA, der bis zu einem Zeitpunkt von 10 Stunden nach der ^{32}P -Gabe noch kein Maximum erreicht hat. Untersuchungen über 5 Stunden hinaus werden besonders durch die hohe Wachstumsrate embryonalen Gewebes erschwert. Der Abfall der spezifischen Aktivität von ^{14}C ist sicherlich zum Teil auf eine Verdünnung der Radioaktivität durch neugebildete, nichtmarkierte DNA zurückzuführen.

In allen folgenden Versuchen erfolgte die Messung der radioaktiven Markierung drei Stunden nach Injektion der Vorstufen. Zu dieser Zeit befindet man sich noch in der Phase des Anstiegs der spezifischen Aktivitäten, erreicht jedoch schon eine relativ hohe Markierungsrate.

4.3. Einbau von ^{14}C -Glucose und ^{32}P in die Kern-DNA und ihre Bausteine

3 Stunden nach Doppelmarkierung in-vivo mit je 1 mCi/kg ^{14}C -Glucose und ^{32}P wurde die DNA nach der beschriebenen Methode isoliert und gereinigt. Die Messung der Radioaktivität der hochgereinigten DNA zeigte, daß beide Vorstufen gut auf den Embryo übergegangen waren und dabei ein Einbau in die Nucleinsäure erfolgte. Die erhaltene spezifische Aktivität, gemessen als dpm/ μg DNA, für ^{14}C von 35.6 dpm und für ^{32}P von 41.3 dpm erschien uns hoch genug, um eine Untersuchung auch der DNA-Bausteine vorzunehmen.

Für die weiteren Untersuchungen wurde die DNA nach der Messung ihrer spezifischen Aktivität zu Mononucleotiden hydrolysiert. Nachdem die einzelnen Nucleotide getrennt und ihre jeweilige Menge in der Lösung bestimmt worden war, erfolgte die Messung der Radioaktivität von ^{14}C und ^{32}P . Die spezifische Aktivität beider Markierungen wurde dann für jedes Nucleotid als dpm/nMol berechnet. Es zeigte sich, daß alle vier Nucleotide eine relativ hohe spezifische Aktivität sowohl für ^{14}C als auch für ^{32}P aufwiesen (Tabelle 5).

Die in den Mononucleotiden gefundene Radioaktivität nach Gabe von ^{14}C -markierter Glucose kann einmal aus dem Deoxyriboseanteil stammen, zum anderen kann auch eine Markierung

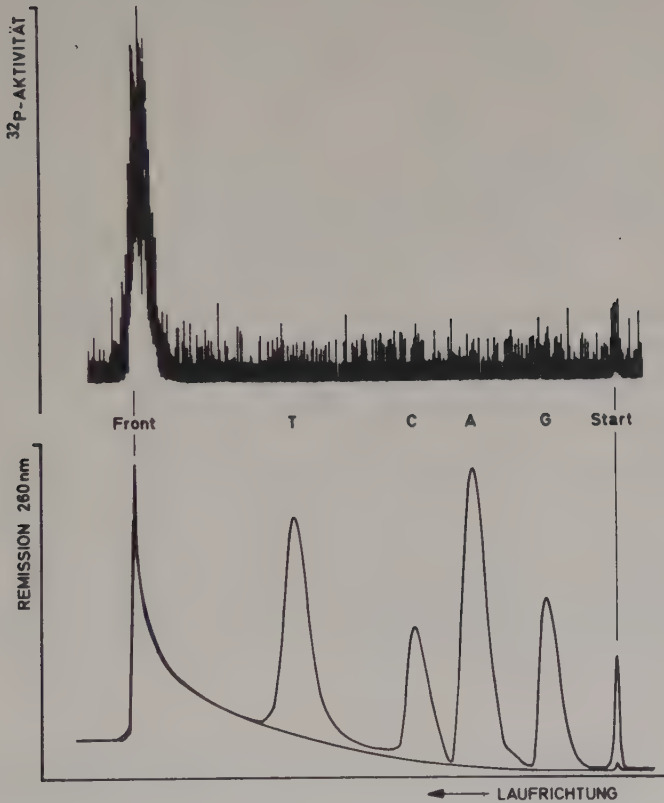


Abbildung 10

Die Abbildung zeigt den Verbleib der ^{32}P -Aktivität nach der Ameisensäure-DNA-Hydrolyse und chromatographischen Trennung der Basen. Der untere Teil der Abbildung stellt das Remissionsspektrum des Chromatogramms dar. Synchron dazu wurde die ^{32}P -Aktivität mit einem Berthold-DC-Scanner gemessen. Zur Vermeidung eines Mitzählens der ^{14}C -Aktivität in den Basen wurde ein mit Aluminiumfolie abgedecktes Zählfenster verwendet.

des Basenanteils vorliegen. Um die Herkunft der ^{14}C -Markierung eindeutig festlegen zu können, wurden daher auch die Basen der DNA isoliert. Die Bestimmung der Radioaktivität nach der Trennung der einzelnen Substanzen ergab einen durchaus meßbaren Einbau der markierten Glucose in die vier Basen (Tabelle 5). Dabei betrug die spezifische Aktivität für ^{14}C in den Basen etwa 15-20 % des Werts, der in den Mononucleotiden gefunden wurde.

Bei der ameisensauren Hydrolyse der DNA erhält man neben den Basen anorganisches Phosphat und C-Bruchstücke aus der Pentose. Beide Verunreinigungen des Basengemisches sind radioaktiv markiert. Es galt daher festzustellen, ob diese markierten Hydrolyseprodukte sich nicht bei der Dünnschichtchromatographie zur Trennung der Basen gleichmäßig über das Chromatogramm verteilen und so eine Markierung der Basen nur vortäuschen. Dafür wurde von uns ^{14}C -markierte Ribose einer ameisensauren Hydrolyse unterzogen und anschließend chromatographiert. Mit einem Berthold-DC-Scanner, Modell LB 2722, wurde die Lage der Radioaktivität auf dem Chromatogramm bestimmt. Es ließ sich damit zeigen, daß die gesamte ^{14}C -Aktivität der Ribosebruchstücke nach der chromatographischen Trennung in der Laufmittelfront zu finden ist. Die Bestimmung der Lage der ^{32}P -Aktivität nach der chromatographischen Trennung eines DNA-Basen-Hydrolysats wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Auch die ^{32}P -Aktivität wurde dabei quantitativ auf der Höhe der Laufmittelfront des Chromatogramms gefunden (Abbildung 10). Damit ist bewiesen, daß die in den Basen gefundene Radioaktivität nur aus einem Einbau während der Biosynthese stammen kann.

4.4. Zusammenfassung von 4.) und Diskussion

In der Tabelle 5 und Abbildung 11 sind die ermittelten spezifischen Aktivitäten für ^{14}C und ^{32}P der DNA-Mononucleotide und -Basen zusammengestellt. Aus dem Vergleich der ^{14}C -Aktivitäten von Nucleotiden und Basen ist zu erkennen, daß der Einbau nach in-vivo Gabe von markierter Glucose hauptsächlich in den Pentoseanteil der DNA erfolgt. Daneben findet aber auch schon während des kurzen Zeitraumes von 3 Stunden ein nennenswerter Einbau der Glucose-Metaboliten in die DNA-Basen

5'-Mono-nucleotide	^{14}C dpm/n Mol	^{32}P dpm/n Mol	Basen	^{14}C dpm/n Mol
d-TMP	7.39 ± 0.21	16.23 ± 0.62	Thymin	2.14 ± 0.10
d-CMP	10.65 ± 0.41	10.29 ± 0.32	Cytosin	1.82 ± 0.06
d-AMP	11.40 ± 0.33	10.68 ± 0.24	Adenin	1.59 ± 0.04
d-GMP	15.68 ± 0.64	14.56 ± 0.41	Guanin	2.30 ± 0.07

Tabelle 5

Die Tabelle gibt die spezifische Aktivität für ^{14}C und ^{32}P in den Mononucleotiden und Basen der Kern-DNA an, nach einer intravenösen Injektion von je 1 mCi/kg ^{14}C -Glucose und ^{32}P . Die Aufarbeitung der Embryonen erfolgte drei Stunden nach der Injektion.

Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 7 Bestimmungen für die Mononucleotide und 9 Bestimmungen für die Basen dar.

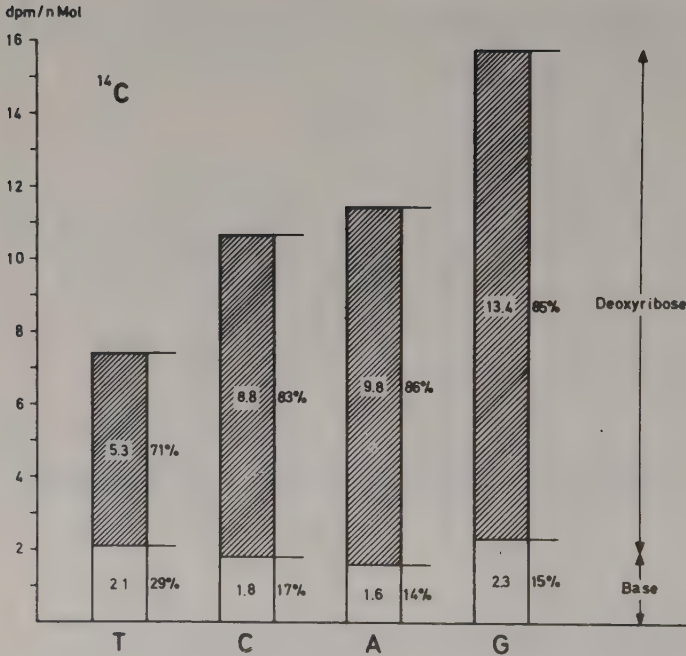


Abbildung 11

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Radioaktivität (dpm/n Mol) von ^{14}C auf den Deoxyribose- und Basenanteil der DNA-Mononucleotide nach einer intravenösen Injektion von 1 mCi/kg ^{14}C -Glucose.

statt. Die Höhe der Markierungsrate in den einzelnen Basen ist ausreichend, um bei späteren Untersuchungen eventuelle Störungen der de-novo-Synthese feststellen zu können. Die geringen Unterschiede der spezifischen Aktivitäten in den Basen lassen vermuten, daß zumindest bei kurzer Einwirkungszeit der markierten Vorstufen der Einbau in die einzelnen Basen etwa gleich schnell erfolgt. Aus unseren Versuchen läßt sich noch keine Aussage über den Umsatz der Basen-Vorstufen während der de-novo-Synthese im embryonalen Gewebe machen. Zur Klärung dieser Frage sind von uns weitere Untersuchungen zu verschiedenen Zeiten vor und nach 3 Stunden geplant.

Aus den spezifischen Aktivitäten für ^{14}C der Mononucleotide geht hervor, daß der Einbau in die Purine offenbar schneller als in die Pyrimidine erfolgt. Die Summe des Einbaus in die Pyrimidin-Nucleotide erreicht dabei nur 67 % der Summe in den Purin-Nucleotiden. Besonders auffällig ist die relativ geringe spezifische Aktivität im Thymin-Nucleotid. Der Unterschied wird noch signifikanter, wenn man gleichzeitig den Einbau von ^{32}P in die einzelnen Mononucleotide betrachtet. Für d-CMP, d-AMP und d-GMP unterscheiden sich die spezifischen Aktivitäten für ^{14}C und ^{32}P nur geringfügig. Dagegen erhält aber das Thymin-Nucleotid den höchsten ^{32}P -Einbau. Es besteht hier die Möglichkeit, daß der ^{14}C -Einbau bei TMP aufgrund des längeren Syntheseweges langsamer erfolgt und nach 3 Stunden noch nicht sein Maximum erreicht hat. Dem spricht aber der hohe ^{32}P -Einbau und der gegenüber den anderen Basen nicht verringerte ^{14}C -Einbau in Thymin entgegen. Eventuell kann auch der Bedarf an TMP nicht voll durch die de-novo-Synthese gedeckt werden, so daß es teilweise zu einem salvage pathway kommt. Ein Neuaufbau zu Nucleotiden aus Thymidin über ATP würde dann auch die höhere spezifische Aktivität für ^{32}P erklären. Erst weitere Versuche, wie sie oben schon erwähnt wurden, könnten hier eine Klärung schaffen.

ITZHAKI u. WHITTLE (69) führten Markierungsversuche mit $^{14}\text{C}_6$ -Glucose in vitro an Thymuszellen durch. Dabei unter-

suchten sie den ^{14}C -Einbau in die Deoxyribose der einzelnen Mononucleotide. Sie fanden relative Radioaktivitäten in den Deoxyribosen von d-AMP = 100, d-GMP = 129, d-CMP = 3 und d-TMP = 6. Ein direkter Vergleich mit den von uns gefundenen Werten ist allerdings nur begrenzt möglich, da von den Autoren bei den Mononucleotiden auch die ^{14}C -Aktivität der Basen mitgezählt wurde. Für die Purine sind unsere Befunde gut vergleichbar mit denen von ITZHAKI. Für die Pyrimidine gibt es bei embryonalem Gewebe aber keinen Anhalt für einen derart langsamen Einbau, wie er von ITZHAKI gezeigt wurde. Anscheinend spielt bei solchen Versuchen die Art des zu untersuchenden Gewebes und die Form der Gabe der markierten Vorstufen - in-vitro zu in-vivo - eine entscheidende Rolle. ITZHAKI hat unter den gleichen Bedingungen auch den Einbau von ^{32}P in die DNA-Mononucleotide untersucht. Die dabei von ihm gefundenen relativen Radioaktivitäten in den vier Mononucleotiden von d-AMP = 100, d-GMP = 123, d-CMP = 114 und d-TMP = 158 stimmen recht gut mit unseren ^{32}P -Werten nach in-vivo-Behandlung überein.

Die Basen-Hydrolyse mit konzentrierter Ameisensäure verläuft quantitativ. Dadurch wurde es uns möglich, die Verhältnisse der einzelnen Basen zueinander, wie sie in der DNA vorliegen, zu bestimmen. Dazu wurden die Basen chromatographisch getrennt, quantitativ aus der Cellulose eluiert und die Menge im einzelnen Eluat photometrisch bestimmt. Die jeweiligen Mengen der vier Basen aus einem Lauf lassen sich dann ins Verhältnis setzen und daraus die molaren Beziehungen errechnen. In der Tabelle 6 sind die molaren Basenverhältnisse der von uns isolierten DNA zusammengestellt und mit Angaben aus der Literatur (20 ,) verglichen worden.

Vor der Aufspaltung in Mononucleotide und Basen wurde jeweils die spezifische Aktivität von ^{14}C und ^{32}P der hochgereinigten DNA gemessen. Diese Ergebnisse dienten uns als Kontrolle der für die Mononucleotide gefundenen spezifischen Aktivitäten. Das Verhältnis der in der DNA vorliegenden Mononucleotide entspricht dem molaren Verhältnis der Basen. So ist es möglich, aus den spezifischen Aktivitäten in den Mononucleotiden auf die Radioaktivität in der Gesamt-DNA zu

Organ	Thymin	Cytosin	Adenin	Guanin
Embryo	29.0	21.0	28.3	21.7
Leber [†]	29.5	20.1	29.1	21.3

Tabelle 6

Die Tabelle gibt die molaren Verhältnisse der einzelnen Basen in der Kern-DNA von Ratten-Embryonen wieder. Die Angabe erfolgt als x Mole Base in 100 Molen DNA. Als Vergleich Werte aus der Literatur von Ratten-Leber[†] (KIRBY 20).

Methode	¹⁴ C dpm/μg DNA	³² P dpm/μg DNA	¹⁴ C/ ³² P dpm/μg DNA
Messung Kern-DNA	35.6	41.3	0.86
Berechnung aus Basen	34.3	39.7	0.86
%v. Kern-DNA	96.3	96.1	100

Tabelle 7

Die Tabelle zeigt die gemessenen spezifischen Aktivitäten von ¹⁴C und ³²P (dpm/μg DNA) der hochgereinigten Kern-DNA nach 3stündiger Behandlung mit je 1 mCi/kg ¹⁴C-Glucose und ³²P. Als Vergleich die aus den spezifischen Aktivitäten der Mononucleotide bzw. Basen errechneten Werte, bezogen auf die Gesamt-DNA und berechnet als dpm/μg DNA.

schließen. Die für die DNA gemessenen Werte und die aus den Mononucleotiden bzw. Basen berechneten Werte der spezifischen Aktivitäten sind in der Tabelle 7 einander gegenübergestellt. Die geringe Differenz (4%) zwischen den beiden Ergebnissen aus Messung und Berechnung und das gleiche Verhältnis von ^{14}C zu ^{32}P stellen nach unserer Meinung einen guten Beweis für die gefundenen spezifischen Aktivitäten in den Mononucleotiden dar.

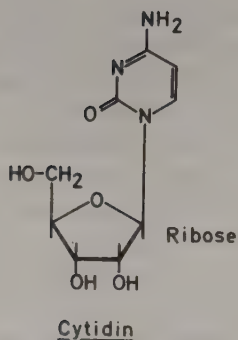
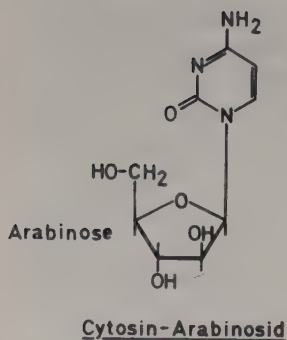
5. Analyse der Wirkung einiger bekannter embryotoxischer Substanzen mit der entwickelten Methode

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde eine Methode vorgestellt, die es erlaubt, DNA aus embryonalem Gewebe zu isolieren und ihre einzelnen Bausteine zu analysieren. Mit Hilfe der erwähnten radioaktiv markierten Vorstufen gelingt es, die DNA-Mononucleotide und -Basen ausreichend zu markieren. In den folgenden Abschnitten soll nun über die Anwendung dieser Methode zur Untersuchung von Pharmakaeinflüssen auf die Nucleinsäuresynthese berichtet werden. Da es uns darauf ankam, die Methode auf ihre Verwendbarkeit für solche Untersuchungen zu testen, wählten wir Pharmaka, deren Wirkung auf die Nucleinsäuresynthese von Untersuchungen an anderen Geweben schon bekannt war.

Eine große Zahl von Substanzen, die heute in der Krebsschemotherapie Verwendung finden, gehören in die Gruppe der sogenannten "Antimetaboliten". Dabei handelt es sich zumeist um künstlich hergestellte Analoge natürlicher Stoffwechselprodukte. Die Abweichungen in der Struktur solcher Antimetaboliten haben Stoffwechselstörungen zur Folge, die in der Regel zu Hemmungen bestimmter Reaktionen führen. Die Wirkung beruht dabei häufig auf einer "Täuschung" bestimmter Enzymsysteme der Zelle, die bis zu einem Einbau der körperfremden Substanz in Makromoleküle des Organismus führen kann. In neuerer Zeit gelang es durch Verwendung markierter Vorstufen und von zellfreien Systemen Einblicke in den Wirkungsmechanismus solcher Analoge zu gewinnen. So auch für die beiden von uns verwendeten Pharmaka - Cytosin-Arabinosid und 6-Mercaptopurin -. Beide Substanzen werden heute in der Krebs-Chemotherapie verwendet.

5.1. Untersuchungen mit Cytosin-Arabinosid

Cytosin-Arabinosid ist ein Antimetabolit aus der Reihe der Pyrimidin-Antagonisten. Die Substanz wird unter der Bezeichnung ALEXAN^R (Firma Heinrich Mack, Illertissen) als Cytostaticum vertrieben.



Im Gegensatz zu den meisten Antimetaboliten, die im Basen-Anteil modifiziert sind, ist dieser Antimetabolit im Zucker-Anteil abgewandelt. Chemisch unterscheidet sich Cytosin-Arabinosid von Cytidin durch Vertauschung der H- und OH-Gruppe im Riboseanteil am C-Atom 2' in ihrer Lage.

5.1.1. Untersuchungen zur Bestimmung der Dosierung

CHAUBE u. MURPHY (70) führten teratologische Untersuchungen mit Cytosin-Arabinosid an schwangeren Ratten durch. Erhielten die Tiere eine einmalige Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht zwischen dem 10. und 12. Tag der Schwangerschaft, so zeigten die behandelten Tiere keine Anomalie und keine erhöhte fetale Sterblichkeit. Die kleinste Dosis, die einen teratogenen Effekt auslöste, war 20 mg/kg. Bei Steigerung der Dosis auf 100 mg/kg zeigten schon 49 % der überlebenden Foeten Anomalien. Mit einer Dosis von 300 mg/kg waren alle Foeten anomal.

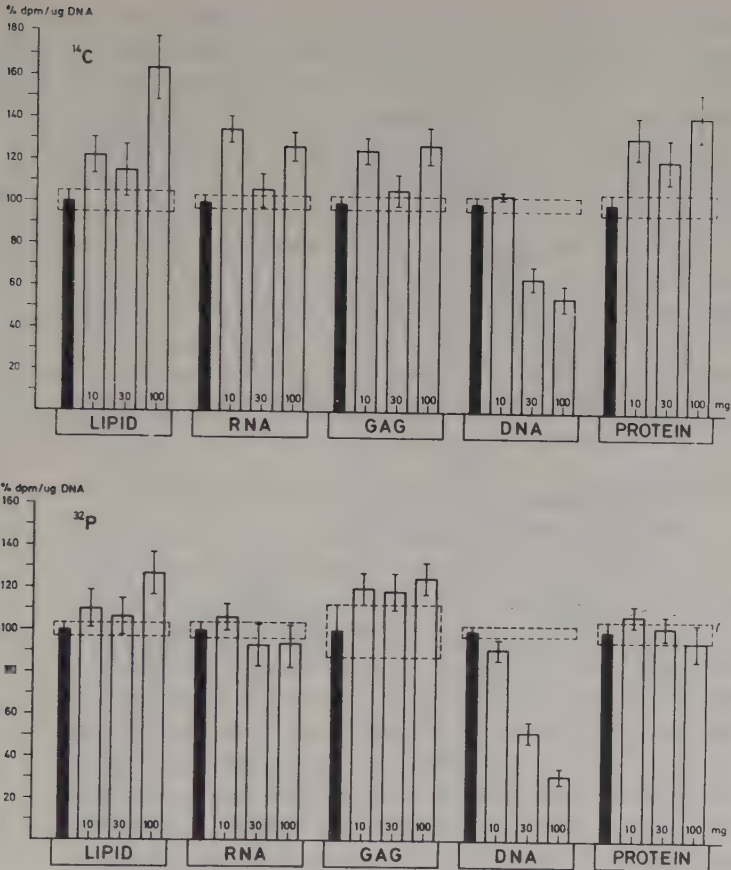


Abbildung 12

Einfluß von Cytosin-Arabinosid (10 ; 30 und 100 mg/kg) auf den Einbau von ^{14}C -Glucose und ^{32}P in die Zellkomponenten des Embryos am Tag 12 der Schwangerschaft. Das Pharmakon wurde 5 Stunden vor der Dekapitation i.p. appliziert. 2 Stunden nach dem Pharmakon erhielten die Tiere je 1 mCi/kg ^{14}C -Glucose und ^{32}P i.v. injiziert. Die Embryonen wurden nach der Screening-Methode in die einzelnen Zellkomponenten aufgetrennt. Die obere Abbildung zeigt die spezifische Aktivität für ^{14}C als % der Kontrolle, die untere die entsprechenden Werte für ^{32}P . Die schwarzen Balken stellen die Mittelwerte der Kontrollen mit den Standardabweichungen dar (n = 5). Die Zahlen in den hellen Balken geben die Cytosin-Arabinosid-Dosen (mg/kg) wieder.

In einem Vorversuch zur Bestimmung der Dosierung gaben wir 3 Stunden vor der DNA-Analyse eine einmalige Dosis von 10 ; 30 bzw. 100 mg/kg Cytosin-Arabinosid intraperitoneal. Die Veränderungen der spezifischen Aktivitäten in den säureunlöslichen Zellkomponenten des Embryos gegenüber den Kontrolltieren zeigt die Abbildung 12. Eine Hemmung des ^{14}C -Einbaus kann nur bei der DNA beobachtet werden. Beim ^{32}P -Einbau tritt ein Effekt neben der DNA auch in geringem Maße bei der RNA ein. Dieser Versuch zeigte, daß eine Dosierung von 30 mg/kg vollständig ausreichend ist, um biochemisch eine Hemmung der DNA-Synthese feststellen zu können. Da der Effekt bei 100 mg/kg noch eindeutiger erscheint, wählten wir für den späteren Hauptversuch die höhere Dosierung.

5.1.2. Untersuchungen über die Verteilung von Cytosin-Arabinosid nach der Injektion

Zur Feststellung der Verteilung des Pharmakons wurden die Versuchstiere mit ^3H -markiertem Cytosin-Arabinosid behandelt. Die Dosis betrug 100 mg/kg mit einer spezifischen Aktivität von 1.22 mCi/ m mol. Verschiedene Zeiten nach der intraperitonealen Injektion erfolgte die Fraktionierung der Embryonen nach der Screening-Methode. Um auch einen Einblick in den Stoffwechsel eines mütterlichen Organs unter gleichen Versuchsbedingungen zu erhalten, untersuchten wir auch die Radioaktivität in der mütterlichen Niere. Gleichzeitig wurde die Aktivität im Serum und im Fruchtwasser gemessen. In den säureunlöslichen Komponenten des Embryos und der Niere, wie Lipiden, Proteinen und Glycosaminoglycanen und auch in beiden Nucleinsäure-Fractionen konnte praktisch keine Markierung nachgewiesen werden. Auch CHU u. FISHER (71) stellten bei Verwendung von hoch radioaktiv markiertem Cytosin-Arabinosid nur einen sehr geringen Einbau in die RNA und DNA von Mäuse-Tumor-Zellen fest. In unserem Versuch wurde eine Radioaktivität nur in den säurelöslichen Fractionen gefunden. Die Abbildung 13 zeigt die Aktivitätsveränderungen in den säurelöslichen Anteilen des Serums und Fruchtwassers als

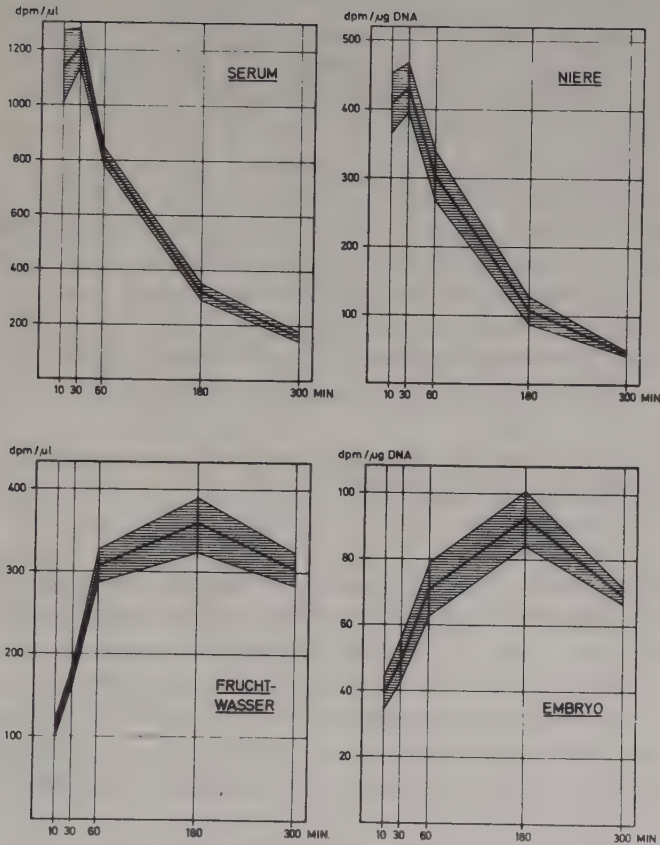


Abbildung 13

Die Abbildung zeigt die Verteilung von ^3H -Cytosin-Arabinosid auf die säurelöslichen Anteile von Serum, Fruchtwasser, Embryo und Niere. Die Tiere erhielten das Pharmakon intraperitoneal in einer Dosierung von 100 mg/kg (^3H -Aktivität 0.5 mCi/kg). Die Radioaktivität im Serum und Fruchtwasser wird als dpm/ μl und im Embryo und Niere als dpm/ $\mu\text{g DNA}$ angegeben. In den säureunlöslichen Fraktionen wurde keine nennenswerte Markierung festgestellt.

dpm/ μ l und für Niere und Embryo als dpm/ μ g DNA. Trotz der unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten kann die zeitliche Abhängigkeit in den verschiedenen Fraktionen gut miteinander verglichen werden. 30 Minuten nach der intraperitonealen Injektion ist das Pharmakon resorbiert, wie aus dem Maximum der Serum- und Nieren-Werte zu erkennen ist. Der Abfall der spezifischen Aktivität im Serum und in der Niere verläuft etwa parallel. Vermutlich erfolgt eine relativ schnelle Ausscheidung der Substanz durch die Niere. Der Aktivitätsanstieg in der säurelöslichen Fraktion des Embryos und im Fruchtwasser verläuft ebenfalls relativ gleichartig. Anscheinend stellt sich hier zwischen beiden ein Gleichgewicht ein. Der Versuch zeigt, daß Cytosin-Arabinosid auf den Embryo übergeht und zwischen 3 bis 5 Stunden nach der Injektion dort die höchste Konzentration erreicht hat.

5.1.3. Einfluß von Cytosin-Arabinosid auf die Synthese der DNA und ihrer Bausteine

Ratten erhielten am Tage 12 der Schwangerschaft 100 mg/kg Cytosin-Arabinosid i.p. injiziert. 2 Stunden nach Gabe des Pharmakons und 3 Stunden vor dem Dekapitieren wurde eine Mischung von je 1mCi/kg ^{14}C -Glucose und ^{32}P intravenös appliziert. Eine gleichgroße Kontrollgruppe erhielt entsprechend nur die markierten Vorstufen. Zur weiteren Kontrolle wurden von jedem schwangeren Tier Serum und Fruchtwasser entnommen und ein Teil der Embryonen nach dem Screening-Verfahren fraktioniert.

Die ^{14}C -Aktivität im Serum und Fruchtwasser der Versuchstiere liegt etwa 40 % über den Werten der Kontrolle. In den Fraktionen des Embryos steigt die Aktivität bis auf 200 % der Kontrollen. Während bei der RNA ebenfalls eine Erhöhung eintritt (154 %) ist bei der DNA eine deutliche Hemmung (68 %) zu erkennen. Die ^{32}P -Aktivität im Serum und Fruchtwasser und allen Zellkomponenten bleibt im Bereich der Kontrollen und ist nur bei der DNA-Fraktion auf 27 % reduziert (Abbildung 8).

FRAKTION	¹⁴ C dpm/μg DNA			³² P dpm/μg DNA		
	Kontr.	ara-C.	% der Kontr.	Kontr.	ara-C.	% der Kontr.
Säurelösl.	112 ± 3	226 ± 44	201	366 ± 40	456 ± 87	125
Lipid	76.4 ± 9.5	158 ± 30	207	10.6 ± 0.8	11.7 ± 2.2	110
RNA	59.5 ± 7.5	91.4 ± 19.1	154	58.3 ± 6.4	56.0 ± 8.9	96
GAG	12.7 ± 0.8	22.8 ± 3.9	180	10.2 ± 1.0	10.1 ± 1.2	99
DNA	37.9 ± 4.2	25.8 ± 5.5	68	28.7 ± 2.7	7.6 ± 1.2	27
Protein	74.7 ± 5.0	148 ± 18	198	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.5	100

Tabelle 8

Verteilung der Radioaktivität (dpm/μg DNA) von ¹⁴C und ³²P auf Zellbestandteile des Embryos nach Behandlung mit 100 mg/kg Cytosinarabinsid.

Die Zahlen stellen Mittelwerte von Untersuchungen an vier verschiedenen Tieren dar. Unter dem Einfluß des Pharmakons kommt es zu einer Erhöhung der Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion. Da die säureunlöslichen Fraktionen aus diesem Depot ihre Synthesebausteine erhalten, führt eine höhere spezifische Aktivität in der säurelöslichen Fraktion auch zu einer allgemeinen Erhöhung der Radioaktivität in den anderen Zellkomponenten. Offensichtlich tritt dieser Effekt bei Cytosin-Arabinosid hauptsächlich bei ¹⁴C ein, wodurch für diese Aktivität die Versuchs- und Kontrollwerte nur schlecht miteinander verglichen werden können. Für die einzelnen Bausteine einer Nucleinsäure ändert sich dabei aber nur die Größenordnung der Markierung, bzw. der Grad der Hemmung, nicht aber das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der Bausteine untereinander.

5.1.3.1. Messung der Radioaktivität in hochgereinigter DNA, Mononucleotiden und Basen

Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten in der isolierten DNA unter dem Einfluß von Cytosin-Arabinosid zeigt für ^{14}C eine Verringerung des Einbaus auf 48 % der Kontrolle. Gleichzeitig sinkt der Einbau von ^{32}P auf 39 % ab (Tabelle 9).

Die für die Gesamt-DNA gefundenen Hemmungen werden nach Auftrennung in die Mononucleotide für beide Aktivitäten gut bestätigt. Die ^{14}C -Werte sind bei den Purin-Deoxynucleotiden auf etwa 50 % zurückgegangen. Die Pyrimidin-Deoxynucleotide werden noch stärker gehemmt und erreichen zwischen 35-40 % der Kontrollwerte. Die spezifische Aktivität für ^{32}P verhält sich für alle vier Deoxynucleotide reicht gleichmäßig. Die Hemmung beträgt hier etwa 60 % (Tabelle 10).

D N A	Kontrolle	ara-C-	% der Kontrolle
^{14}C dpm/ μg	36.2 $\pm$ 0.4	17.4 $\pm$ 0.3	48
^{32}P dpm/ μg	40.9 $\pm$ 0.3	15.9 $\pm$ 0.2	39

Tabelle 9

Die Tabelle gibt die Einbauraten für ^{14}C und ^{32}P (dpm/ μg) in der hochgereinigten DNA der Kontrolle und nach Behandlung mit Cytosin-Arabinosid (100 mg/kg) an.

5'-NUCLEOTIDE	¹⁴ C		
	Kontrolle dpm/n mol	ara-C dpm/n mol	% der Kontrolle
d-TMP	7.4 ± 0.1	3.0 ± 0.1	41
d-CMP	11.4 ± 0.5	4.0 ± 0.1	35
d-AMP	11.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2	48
d-GMP	15.7 ± 0.6	8.3 ± 0.3	53
³² P			
d-TMP	16.2 ± 0.5	6.0 ± 0.2	37
d-CMP	10.3 ± 0.5	4.1 ± 0.1	40
d-AMP	10.7 ± 0.4	3.8 ± 0.2	36
d-GMP	14.6 ± 0.5	6.2 ± 0.2	42

Tabelle 10

Die Tabelle gibt den Einbau (dpm/n mol) in die DNA-Mononucleotiden der Kontrolle und nach Behandlung mit Cytosin-Arabinosid (100 mg/kg) an. Es sind Mittelwerte aus 7 Bestimmungen nach der enzymatischen Hydrolyse aufgeführt. Die Streuungen geben daher den methodischen Fehler wieder.

Auch die DNA-Basen zeigen eine fast gleichmäßige Hemmung, wobei die ^{14}C -Aktivität gegenüber den Kontrollen jeweils bei etwa 40 % liegt (Tabelle 11).

5.1.4. Zusammenfassung und Diskussion

Cytosin-Arabinosid hemmt - wie an Leukämie-Zellen nachgewiesen werden konnte - die DNA-Synthese (CHU u. FISHER 72) (KIM u. EIDINOFF 73) (RITTER et al. 74). Die RNA- und Protein-Synthese verläuft in den durch Cytosin-Arabinosid gehemmten Zellen weiter (FURTH u. COHEN 75). Von diesen Autoren wurde nach in-vitro Versuchen an Zellkulturen als Wirkungsmechanismus eine Hemmung der Reduktion von Cytidindiphosphat zur entsprechenden Deoxyverbindung vermutet. Durch die Blockierung der Reduktion wird die Bildung von Deoxycytidintriphosphat unterdrückt. Damit ist der DNA-Synthese ein Substrat entzogen und die Synthese bleibt stehen.

SILAGI (76) hielt nach seinen Untersuchungen auch eine Phosphorylierung von Cytosin-Arabinosid bis zum Triphosphat und einen Einbau in die DNA für möglich. Wie wir schon unter 5.1.2. berichteten, gibt es aber für einen meßbaren Einbau in embryonale DNA unter unseren Versuchsbedingungen keinen Anhaltspunkt (CHU und FISHER 71). Wir fanden bei embryonalem Gewebe ebenfalls keinen Einbau in die anderen säureunlöslichen Komponenten nach Behandlung mit ^3H -markiertem Cytosin-Arabinosid.

In jüngster Zeit wird als die entscheidende Wirkung von Cytosin-Arabinosid die Hemmung der DNA-Polymerase angesehen (FURTH u. COHEN 75) (INAGAKI et al. 77).

Dieses Ferment katalysiert wahrscheinlich die Synthese von DNA aus den 4 Nucleosid Triphosphaten nach der Matrize der bereits vorhandenen DNA. Es stellt daher wohl eines der Schlüsselenzyme bei der DNA-Synthese dar.

Bei unseren in-vivo Untersuchungen an embryonalem Gewebe fanden wir eine etwa 50%ige Hemmung der DNA-Synthese 5 Stunden nach Behandlung mit 100 mg/kg Cytosin-Arabinosid. Eine

BASEN	^{14}C		
	Kontrolle dpm/n mol	ara-C dpm/n mol	% der Kontrolle
Thymin	1.99 ± 0.06	0.75 ± 0.01	37
Cytosin	1.78 ± 0.01	0.66 ± 0.02	37
Adenin	1.59 ± 0.01	0.65 ± 0.02	41
Guanin	2.25 ± 0.01	0.95 ± 0.03	42

Tabelle 11

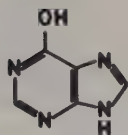
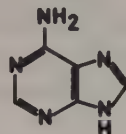
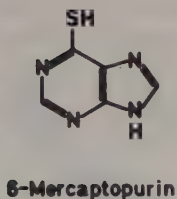
Die Tabelle gibt den Einbau (dpm/n mol) in die DNA-Basen der Kontrolle und nach Behandlung mit Cytosin-Arabinosid (100 mg/kg) an. Es sind Mittelwerte aus 8 Bestimmungen nach der Hydrolyse aufgeführt. Die Streuungen geben den methodischen Fehler wieder.

gleichzeitige Untersuchung der ribosomalen RNA ergab jedoch einen leichten Anstieg der Synthese von Ribonucleinsäure (MEWES 1).

Sowohl für die einzelnen Deoxynucleotide als auch für die DNA-Basen war die ^{14}C -Aktivität und ebenfalls die ^{32}P -Aktivität recht gleichmäßig abgesunken. Der nur geringe Unterschied der Hemmungen in den Purinen und Pyrimidinen spricht nicht für eine spezifische Blockierung der Reductase für Cytosindinucleotide. Ein Angriff an dieser Stelle müßte eine bedeutend stärkere Hemmung des Glucose-Einbaus in die Pyrimidine zur Folge haben. Unsere Ergebnisse zeigen aber einen generalisierten Effekt, der vermuten läßt, daß eine normale de-novo-Synthese der Bausteine erfolgt und die Hemmung erst in einer späten Stufe der DNA-Synthese eintritt. Eine Blockierung der DNA-Polymerase scheint hier am wahrscheinlichsten.

5.2. Untersuchungen mit 6-Mercaptopurin

6-Mercaptopurin ist ein Antimetabolit aus der Reihe der Purin-Antagonisten. Die Substanz wurde 1952 von ELION et al. (78) synthetisiert. Unter dem Handelsnamen PURI-NETHOL^R (Firma Borroughs Wellcome u. Co.) wird die Verbindung zur Behandlung von einigen Tumoren, bei akuter Leukämie sowie als das Derivat Azathioprin besonders zur Immunsuppression benutzt.



Chemisch unterscheidet sich 6-Mercaptopurin von Adenin und Hypoxanthin durch eine SH-Gruppe anstelle der NH₂-Gruppe oder OH-Gruppe. Hypoxanthin ist die Base des Inosins. Bei der de-novo-Synthese der Purine stellt das Inosin-Monophosphat (IMP) eine gemeinsame Zwischenstufe bei der Bildung von Adenin und Guanin dar (Abbildung 7).

Teratologische Untersuchungen von MURPHY (79) an schwangeren Ratten ergaben als embryotoxische Dosis den Bereich von 50 - 150 mg/kg Körpergewicht. Für alle von uns durchgeführten

Versuche mit 6-Mercaptopurin wurde eine mittlere Dosis von 100 mg/kg gewählt. Die Applikation erfolgte auch hier intraperitoneal.

5.2.1. Untersuchungen über die Verteilung von 6-Mercaptopurin nach der Injektion

Die Verteilung des Pharmakons über den Organismus wurde mit ^{35}S -markiertem 6-Mercaptopurin untersucht. Dafür erhielten Ratten am Tag 12 der Schwangerschaft 100 mg/kg i.p. injiziert. Die ^{35}S -Aktivität betrug 1 mCi/kg. Leber und Niere der Muttertiere und die Embryonen wurden nach der Screening-Methode aufgearbeitet und die ^{35}S -Markierung in den einzelnen Fraktionen gemessen. Ein Vergleich der Markierungsrate in den säurelöslichen Anteilen zeigt, daß nach 1 Stunde das Maximum anscheinend schon überschritten ist (Abbildung 14). Im Serum sinkt die Aktivität in 3 bzw. 5 Stunden schnell ab. Die Ausscheidung des Pharmakons durch die Niere erfolgt sehr schnell und ist praktisch nach 3 Stunden beendet. Im Fruchtwasser und in der säurelöslichen Fraktion des Embryos verläuft der Aktivitätsabfall recht gleichmäßig. Nach 3 Stunden sind in beiden Fraktionen noch etwa 50 % der Aktivität vorhanden, die nach 1 Stunde gefunden wird. Der Wert verändert sich dann nur noch geringfügig.

Etwa 10 % der Radioaktivität des Embryos befindet sich verteilt auf alle säureunlöslichen Komponenten (Abbildung 15). Während die Markierung in der Lipid-, Glycosaminoglycan- und Protein-Fraktion mit der Zeit geringer wird, bleibt der Wert in der RNA-Fraktion annähernd konstant. In der DNA steigt die spezifische Aktivität weiter an und erreicht nach 5 Stunden eine doppelt so hohe Markierung als in der RNA.

Untersuchungen von BIEBER et al. (80) über den Einbau von ^{35}S -markiertem 6-Mercaptopurin in die Nucleinsäuren von Tumoren zeigten ähnliche Befunde. Auch diese Autoren konnten in beiden Nucleinsäuren eine ^{35}S -Aktivität nachweisen.

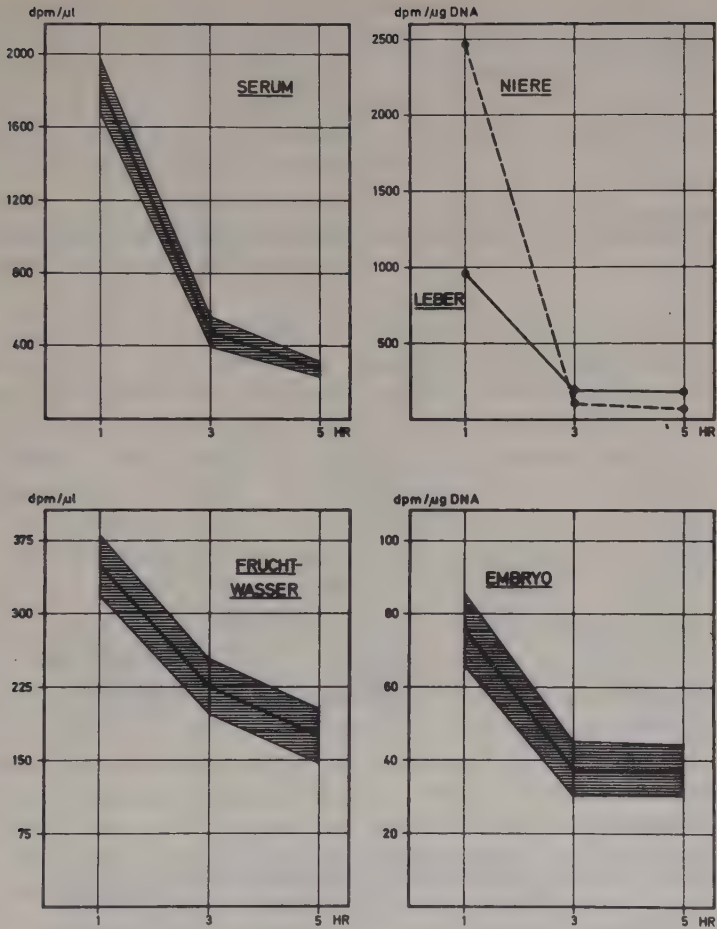


Abbildung 14

Die Abbildung zeigt die Verteilung von ^{35}S -6-Mercaptopurin auf die säurelöslichen Anteile von Serum, Fruchtwasser, Embryo, sowie mütterlicher Leber und Niere. Die Tiere erhielten das Pharmakon intraperitoneal in einer Dosierung von 100 mg/kg (^{35}S -Aktivität 1 mCi/kg). Die Radioaktivität im Serum und Fruchtwasser wird als dpm/μl und im Embryo, Leber und Niere als dpm/μg angegeben.

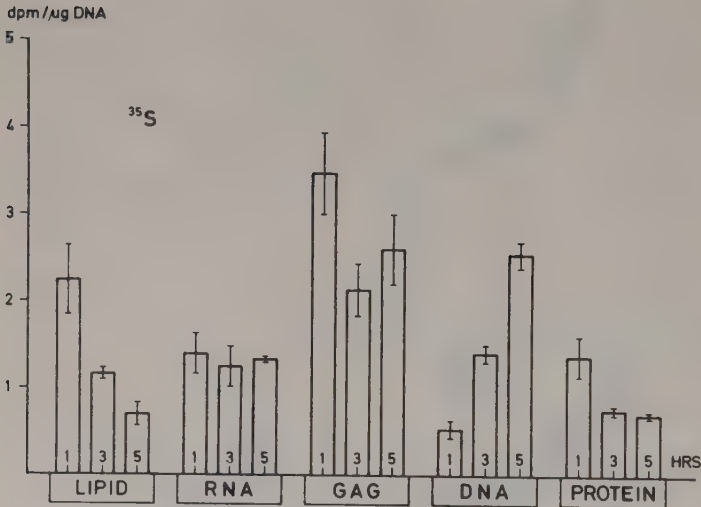


Abbildung 15

Die Abbildung zeigt die Verteilung von ^{35}S -markiertem 6-Mercaptopurin auf die säureunlöslichen Fraktionen des Embryos. Die Applikation des Pharmakons erfolgte intraperitoneal in einer Dosierung von 100 mg/kg (^{35}S -Aktivität 1 mCi/kg).

Die vergleichsweise hohe Markierung der GAG-Fraktion kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß 6-MP zu anorganischem ^{35}S abgebaut wird und dieses in die sauren Glycosaminoglycane eingebaut wird.

Auch hier war die DNA stets höher markiert als die RNA. Allerdings ist bisher noch ungeklärt, ob ein wirklicher Einbau in die Nucleinsäuren oder nur eine Anheftung über die Mercaptogruppe stattfindet. Weitere Versuche zu diesem Problem wurden von uns begonnen, brachten bisher aber noch keine abschließende Klärung dieser Frage.

5.2.2. Einfluß von 6-Mercaptopurin auf die Synthese der DNA und ihrer Bausteine

Da 6-Mercaptopurin in physiologischer Kochsalzlösung nicht löslich ist, mußte zur Herstellung der Injektionslösung ein anderes Lösungsmittel verwendet werden. 100 mg 6-Mercaptopurin wurden daher in 5 ml Propylenglykol unter leichtem Erwärmen gelöst. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 200 g erhielt so jedes Tier etwa 1 ml injiziert. Diese Menge an Propylenglykol wirkte stark sedierend und führte bei einigen Tieren sogar bis zum Schlaf. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, bekamen die Kontrolltiere zur gleichen Zeit eine entsprechende Menge reines Propylenglykol intraperitoneal injiziert.

Ratten am Tag 12 der Schwangerschaft erhielten eine einmalige Injektion i.p. von 100 mg/kg 6-Mercaptopurin in Propylenglykol. Die Untersuchungen wurden an zwei Tiergruppen mit unterschiedlicher Behandlungszeit - 3 bzw. 5 Stunden - durchgeführt. Jeweils 3 Stunden vor der Dekapitation erfolgte die Applikation der markierten Vorstufen (je 1 mCi/kg ^{14}C -Glucose und ^{32}P).

Die Radioaktivität im Serum und im säurelöslichen Anteil des Fruchtwassers der einzelnen Tiere sind in der Tabelle 12 zusammengestellt. Ein langsames Absinken der ^{14}C -Radioaktivität aus der Glucose im Serum von behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrollen zeigt, daß die benutzte Dosis des Antimetaboliten auch auf den Stoffwechsel des Muttertieres nicht völlig indifferent ist - obgleich stärkere Vergiftungssymptome beim erwachsenen Tier nicht beobachtet werden können. Ähnliche Resultate wurden auch mit anderen Antimetabo-

SERUM	^{14}C dpm/ μl	^{32}P dpm/ μl	n
Kontrolle	674 $\pm$ 110	351 $\pm$ 45	15
6-MP 3 ^h	886 $\pm$ 138	361 $\pm$ 36	14
6-MP 5 ^h	817 $\pm$ 118	281 $\pm$ 42	14
FRUCHTWASSER			
Kontrolle	71 $\pm$ 14	46 $\pm$ 5	15
6-MP 3 ^h	84 $\pm$ 16	47 $\pm$ 4	14
6-MP 5 ^h	73 $\pm$ 19	51 $\pm$ 6	14

Tabelle 12

Die Tabelle zeigt die Radioaktivität im Serum und im säurelöslichen Anteil des Fruchtwassers der Kontrolltiere und nach Behandlung mit 100 mg/kg 6-Mercaptopurin über 3 bzw. 5 Stunden. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. n = Zahl der Tiere.

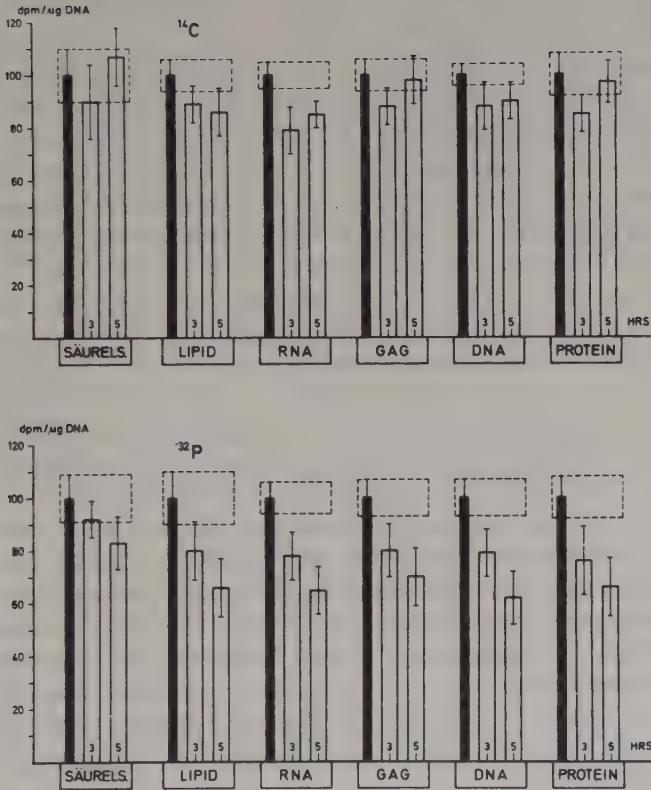


Abbildung 16

Einfluß von 6-Mercaptopurin (100 mg/kg) auf den Einbau von ^{14}C -Glucose und ^{32}P (je 1 mCi/kg) in die Zellkomponenten des Embryos nach 3 bzw. 5 Stunden. Die obere Abbildung zeigt die spezifische Aktivität für ^{14}C als % der Kontrollwerte, die untere die entsprechenden Werte für ^{32}P . Die schwarzen Balken stellen die Mittelwerte der Kontrollen dar (n = 4).

liten erzielt. Der Glucose-Stoffwechsel stellt offenbar ein recht empfindliches Kriterium zur Beurteilung einer toxischen Wirkung dar. Es wäre jedoch auch denkbar, daß durch das Pharmakon die Permeabilität der Zellmembranen, evtl. auch der Placenta, verändert wird.

3 Stunden nach der Behandlung mit 6-Mercaptopurin ist eine leichte Hemmung des ^{14}C -Einbaus bei allen säureunlöslichen Zellkomponenten feststellbar; am stärksten ist die RNA-Fraktion betroffen (Abbildung 16). 5 Stunden nach der Gabe des Pharmakons ist schon fast wieder eine Normalisierung eingetreten. Die Hemmung des ^{32}P -Einbaus ist schon nach 3 Stunden stärker als die von ^{14}C . Nach 5 Stunden liegen die spezifischen Aktivitäten aller Komponenten für ^{32}P noch tiefer. Hierbei verhalten sich die beiden Nucleinsäuren etwa gleich.

5.2.2.1. Messung des Einbaus von radioaktiven Vorstufen in hochgereinigte DNA, Mononucleotide und Basen

Das schon mit der Screening-Methode gefundene Resultat wurde auch nach der Bestimmung der Radioaktivität in die hochgereinigten DNA bestätigt (Tabelle 13). Unter dem Einfluß von 6-Mercaptopurin ist die ^{14}C -Einbaurrate nach 3 Stunden am stärksten vermindert, der Effekt ist aber relativ gering. Mit zunehmender Zeit nach der Gabe des Pharmakons nimmt der hemmende Einfluß dann wieder ab. Dagegen ist das Maximum der Hemmung im Phosphatstoffwechsel auch nach 5 Stunden noch nicht erreicht.

Die nur geringe Hemmung des ^{14}C -Einbaus in die DNA wird verständlicher, wenn man die Verhältnisse in den Nucleotiden betrachtet (Tabelle 14): Nach 3 Stunden ist eine Hemmung des Einbaus nur in den Purin-Deoxynucleotiden nachweisbar. Nach 5 Stunden beträgt die Hemmung in d-AMP immer noch 20 %, wogegen die spezifische Aktivität im d-GMP um 25 % über den Kontrollwerten liegt. Die Werte für d-TMP sind über beide Zeiten hin leicht erhöht. Eine geringe Hemmung

D N A	^{14}C dpm/ μg	% der Kontrolle	^{32}P dpm/ μg	% der Kontrolle
Kontrolle	54.8 $\pm$ 0.2	—	34.8 $\pm$ 0.3	—
6-MP 3 ^h	47.6 $\pm$ 0.3	87	26.4 $\pm$ 0.2	76
6-MP 5 ^h	51.5 $\pm$ 0.4	94	23.3 $\pm$ 0.3	67

Tabelle 13

Die Tabelle gibt die Radioaktivität in der DNA (dpm/ μg DNA) für ^{14}C und ^{32}P in der hochgereinigten Fraktion der Kontrolle und nach Behandlung mit 100 mg/kg 6-Mercaptopurin nach 3 bzw. 5 Stunden an.

des Einbaus in d-CMP wird erst nach 5 Stunden meßbar.

Die Werte für den ^{32}P -Einbau verhalten sich nach 3 Stunden in allen vier Deoxynucleotiden etwa gleich. Die Hemmung beträgt hier zwischen 20-30 %. Bis auf d-GMP zeigen die Deoxynucleotide nach 5 Stunden eine gleichmäßig weiter abgesunkene spezifische Aktivität. Die ^{32}P -Aktivität im d-GMP hat zu dieser Zeit wieder annähernd die Kontrollwerte erreicht.

Auch in den Basen ist die Radioaktivität in den Purinen nach 3 Stunden zwischen 20-30 % gegenüber den Kontrollen verringert (Tabelle 15). Thymin zeigt dagegen keine Verminderung des Einbaus, wogegen Cytosin sowohl nach 3 als auch nach 5 Stunden einen schwach gehemmten Einbau aufweist. Die spezifischen Aktivitäten in den Purinen befinden sich nach 5 Stunden wieder im Bereich der Kontrollen.

5.2.3. Zusammenfassung und Diskussion

6-Mercaptopurin wird in der Zelle durch die Einwirkung von Pyrophosphorylasen mit PRPP zum Ribonucleotid kondensiert. Das so entstandene Thioinosinmonophosphat gilt als Hemmstoff der Synthese von Purin-Bausteinen. Dabei kommt es

5'-NUCLEO- TIDE	¹⁴ C				
	Kontrolle dpm/n mol	6-MP 3 ^h dpm/n mol	% der Kontr.	6-MP 5 ^h dpm/n mol	% der Kontr.
d-TMP	12.1 ± 0.3	13.1 ± 0.3	108	13.0 ± 0.7	107
d-CMP	14.8 ± 0.7	14.7 ± 0.8	99	13.3 ± 0.5	90
d-AMP	20.9 ± 0.8	14.7 ± 0.5	70	16.8 ± 0.5	80
d-GMP	26.0 ± 0.2	20.7 ± 0.5	79	32.5 ± 1.4	125
	³² P				
d-TMP	14.2 ± 0.4	10.2 ± 0.2	72	9.0 ± 0.4	63
d-CMP	7.2 ± 0.3	6.0 ± 0.4	83	4.8 ± 0.2	67
d-AMP	11.8 ± 0.5	8.1 ± 0.2	69	7.5 ± 0.6	64
d-GMP	13.5 ± 0.6	10.8 ± 0.5	80	13.2 ± 0.5	98

Tabelle 14

Die Tabelle gibt die spezifische Aktivität (dpm/n mol) für ¹⁴C und ³²P in den DNA-Mononucleotiden der Kontrolle und nach Behandlung mit 100 mg/kg 6-Mercaptopurin nach 3 bzw. 5 Stunden an. Es sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen nach der enzymatischen Hydrolyse angegeben. Die Streuungen geben den methodischen Fehler wieder.

BASEN	¹⁴ C				
	Kontrolle dpm/n mol	6-MP 3 ^h dpm/n mol	% der Kontr.	6-MP 5 ^h dpm/n mol	% der Kontr.
Thymin	2.33 ±0.02	2.48 ±0.01	106	2.30 ±0.03	99
Cytosin	1.89 ±0.04	1.76 ±0.07	93	1.73 ±0.05	91
Adenin	1.60 ±0.04	1.31 ±0.02	82	1.59 ±0.05	99
Guanin	2.37 ±0.05	1.69 ±0.06	71	2.31 ±0.03	98

Tabelle 15

Die Tabelle gibt die spezifische Aktivität (dpm/n mol) in den DNA-Basen der Kontrolle und nach Behandlung mit 100 mg/kg 6-Mercaptopurin nach 3 bzw. 5 Stunden an. Es sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen nach der Hydrolyse aufgeführt. Die Streuungen geben den methodischen Fehler wieder.

offenbar zu einer Behinderung der Inosin-monophosphat-Dehydrogenase durch Bildung von Disulfidbrücken zwischen den SH-Gruppen des Enzyms und des 6-MP-Ribotids. Die Folge ist eine Hemmung der Umwandlung von IMP in XMP und weiter der Synthese zu GMP. (HAMPTON 81). Ein weiterer Effekt des 6-Mercaptopurins liegt in der Hemmung der Purin-de-novo-Synthese auf einer frühen Stufe. Nach MCCOLLISTER et al. (82) wird über eine allosterische Hemmung die Bildung von Phosphoribosylamin, einem sehr frühen Produkt der de-novo-Synthese, gestört. Hierdurch wird ein hemmender Effekt auf die Synthese beider Purine ausgelöst.

Nach den für die DNA-Nucleotide und -Basen gefundenen Werten ist auch im embryonalen Gewebe die Hemmung durch 6-Mercaptopurin hauptsächlich auf die Purinanteile der Nucleinsäure beschränkt. Die Hemmung in den Basen spricht für einen direkten Angriff des Pharmakons auf die de-novo-Synthese. Dieser Effekt ist für beide Purinbasen nach 5 Stunden abgeklungen. Aus den relativ geringen Hemmungen nach 3 Stunden kann vermutet werden, daß ein maximaler Effekt schon zu einem früheren Zeitpunkt auftritt. Weitere Versuche mit kürzerer Behandlungszeit sind hier unbedingt erforderlich. Die stärkere Hemmung auf das Guanin könnte möglicherweise eine Blockierung der IMP-Dehydrogenase bestätigen.

Aus den Ergebnissen der Nucleotidbestimmungen ist abzuleiten, daß 6-Mercaptopurin auf mehrere Reaktionen während der Nucleinsäure-Synthese einen Einfluß nimmt. Die Hemmung der ^{14}C -Aktivität in den Pentoseanteilen der Purin-Dexynucleotide und die Verringerung des ^{32}P -Einbaus könnte mit einer verminderten IMP-Synthese erklärt werden. Da auch die Pyrimidin-Deoxynucleotide einen gehemmten Phosphat-Stoffwechsel haben, ist daneben auch ein genereller Einfluß von 6-Mercaptopurin auf Phosphorylierungsreaktionen und damit auf entsprechende Kinasen denkbar.

Interessant sind besonders die Einbauverhältnisse beim d-GMP. Während für d-AMP beide Aktivitäten vermindert sind, ist für d-GMP die ^{14}C -Aktivität weit über die Kontrolle hinausgeschossen und die ^{32}P -Aktivität gegenüber d-AMP ebenfalls erhöht. Zur Erklärung dieser Erscheinung kann u.a. eine feedback-Reaktion angenommen werden. Daneben besteht aber auch die Möglichkeit, daß unter dem Einfluß eines Pharmakons auch im embryonalen Gewebe ein salvage-pathway erzwungen werden kann.

6. Ausblick und Weiterführung der Experimente

Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden zur Untersuchung von DNA-Stoffwechselvorgängen sind zeitlich außerordentlich aufwendig. So wird zur Auswertung eines Versuchs, bestehend aus einer Kontrollgruppe und zwei Versuchsgruppen, heute eine Zeit von 4 - 6 Wochen intensiver Arbeit benötigt. Es empfiehlt sich daher eine gezielte Bearbeitung bestimmter Probleme, nachdem mit dem "Screening Test" ein grober Anhalt für eine Stoffwechselstörung erhalten wurde. Durch Einsetzen modernster Geräte sind sicherlich einige methodische Arbeiten zu vereinfachen. In diesem Zusammenhang ist unter anderem geplant, zur Trennung der einzelnen Bausteine einen Nukleotid-Analysator einzusetzen. Nach Umstellung eines solchen Gerätes auf unsere Problematik müßte der zeitraubendste Teil der Methode - die chromatographische bzw. elektrophoretische Trennung, die anschließende Elution und quantitative Bestimmung der Einzelproben - erheblich vereinfacht werden können.

Weitere Untersuchungen unter Anwendung der gegebenen Methode sind erforderlich, um einen genaueren Einblick in die Nucleinsäure-Stoffwechselvorgänge zu erhalten und die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Pharmaka besser beurteilen zu können. Einige Experimente dazu wurden bereits begonnen.

Die zeitliche Abhängigkeit des Einbaus der beiden radioaktiv markierten Vorstufen in die DNA-Fraktion ist schon beschrieben worden. Unbekannt dagegen ist das Verhältnis des Einbaus während der Markierungszeit in den einzelnen Bausteinen der Nucleinsäure. Besonders im Hinblick auf eine Unterscheidung zwischen einer de-novo-Synthese und der Benutzung eines salvage pathways zur Synthese - besonders unter dem Einfluß von Pharmaka - sind solche Untersuchungen sicherlich wichtig. Es gilt dabei vor allem festzustellen, ob der Einbau der einzelnen Vorstufe - z.B. ^{14}C -Glucose - in die verschiedenen Nucleotide synchron erfolgt und wie sich dazu der Einbau von ^{32}P verhält.

Eine andere interessante Frage ist das Verhältnis der Pool-Größen in den Zellen nach der Behandlung mit Pharmaka. Veränderungen dieser Größe lösen mit Sicherheit eine Reihe von Reaktionen auf verschiedene Stoffwechselvorgänge aus. Die Vielzahl der in den Zellen vorliegenden Substanzen bereiten hier natürlich einige methodische Schwierigkeiten. Da für unser Problem besonders eine Aussage über das vorliegende Angebot an markierten, freien Trinucleotiden interessant ist, müßte eine darauf beschränkte Untersuchung aber methodisch möglich sein.

Der Vorteil einer biochemischen Methode, wie sie hier verwendet wurde, gegenüber den heute meist noch angewandten morphologischen Untersuchungen über die Wirkung von embryotoxischen Substanzen liegt hauptsächlich in einer Möglichkeit mit geringen Dosen und nach kurzen Einwirkungszeiten schon Effekte beobachten zu können. In diesem Zusammenhang soll geklärt werden, ob Einflüsse einer Substanz auf die Nucleinsäure-Synthese auch mit Mengen festgestellt werden können, die unter der Dosis liegen, mit der im morphologisch-teratologischen Versuch ein Effekt nachweisbar ist. Dazu soll bei künftigen Versuchen eine Tiergruppe stets für morphologisch-teratologische Untersuchungen mitbehandelt werden.

Die von uns bisher durchgeführten Versuche mit Pharmaka sollten vor allem zeigen, daß die erarbeitete Methode auf unsere Problematik anwendbar ist. Weiterführende Untersuchungen mit Cytosin-Arabinosid und 6-Mercaptopurin sind in den einzelnen Abschnitten dieser Arbeit schon erwähnt worden. Besonders die Frage eines Einbaus von 6-Mercaptopurin in die Nucleinsäuren erscheint uns nach den bisherigen Ergebnissen interessant. Da sich eine Reihe von Schwierigkeiten bei der Verwendung von ^{35}S -markiertem 6-MP ergaben - Empfindlichkeit der SH-Gruppe gegenüber Säuren und Basen -, sollen diese Untersuchungen mit ringmarkiertem ^{14}C -6-Mercaptopurin fortgesetzt werden. Als wesentliches Resultat dieser Arbeit kann wohl aus den Versuchen mit Pharmaka - Cytosin-Arabinosid und 6-MP - abgelesen werden, daß eine Analyse eines pharmakologischen Eingriffs in den DNA-Stoff-

wechsel möglich ist. Besonders die Versuche mit 6-MP zeigen, daß auch ein umschriebener Effekt bei der Bildung von DNA-Vorstufen lokalisiert werden kann. Damit erscheint es lohnend, den Effekt weiterer Pharmaka mit diesem System zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

1.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode beschrieben, die es erlaubt, Untersuchungen der Stoffwechselvorgänge in der Zellkern-DNA von Ratten-Embryonen in-vivo durchzuführen. Von besonderem Interesse ist dafür die Erarbeitung von Methoden zur Aufspaltung der DNA in ihre Mononucleotide und Basen.

2.

Es wird gezeigt, daß aus embryonalem Gewebe von Ratten am Tag 12 der Schwangerschaft eine Kern-DNA hoher Reinheit isoliert werden kann. Eine enzymatische Hydrolyse mit selbst-bereiteter Phosphodiesterase liefert die Mononucleotide. Aus einer sauren Hydrolyse wurden die Basen gewonnen. Die einzelnen DNA-Bausteine konnten dann sauber voneinander getrennt werden.

3.

Die in-vivo Behandlung der Muttertiere mit markierten Vorstufen - ^{14}C -Glucose (uniform) und ^{32}P -Phosphat - führt zu einer Doppelmarkierung der embryonalen Zellkern-DNA. Nach der Hydrolyse und Trennung der einzelnen DNA-Bausteine kann sowohl in den Mononucleotiden, als auch in den isolierten Basen eine meßbare spezifische Aktivität festgestellt werden.

4.

In-vivo Untersuchungen unter dem Einfluß von embryotoxischen Pharmaka erbrachten den Beweis, daß mit der vorliegenden biochemischen Methode Effekte auf die Nucleinsäure-Synthese festgestellt werden können. Durch die Auftrennung in die einzelnen Bausteine und deren Messung wird ein guter Überblick über die Wirkungsweise eines Pharmakons auf die DNA-Synthese gewonnen.

5.

Der für Cytosin-Arabinosid gefundene Einfluß auf die DNA-Synthese in Art eines generalisierten Effektes bestätigt den heute bekannten Wirkungsmechanismus dieses Pharmakons, und spricht für einen Angriff an der DNA-Polymerase auch im embryonalen Gewebe.

6.

Die Versuche mit 6-Mercaptopurin zeigen deutlich, daß mit Hilfe der ausgearbeiteten Methode auch spezifische Einflüsse auf definierte Schritte der Nucleinsäure-Synthese gut nachgewiesen werden können. Eine Hemmung der Synthese wurde hier nur für die Purine und besonders Adenin gefunden.

7.

Die Brauchbarkeit der Methode zur Analyse der Wirkungsweise embryotoxischer Pharmaka wird diskutiert.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) MEWES, P.: Methode zur Bestimmung der RNA-Synthese im embryonalen Säugetiergewebe und Untersuchungen über den Einfluß von 6-Mercaptopurin und Cytosinarabinsid
in: Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1971)
- (2) KÖHLER, E., MERKER, H-J., EHMKE, W., WOINOROWICZ, T.: Growth Kinetics of Mamalian Embryos During the Stage of Differentiation
in: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmak. (in press)(1972)
- (3) SCHNEIDER, R.M., PETERMAN, R.: Nuclei from Normal und Leukemic Mouse Spleen. I. The Isolation of Nuclei in Neutral Medium
in: Cancer Research, 10 (1950), p. 751
- (4) PHILPOT, J.S.L., STANIER, J.E.: The Choice of the Suspension Medium for Rat-Liver-Cell Nuclei
in: Biochem. J., 63 (1956) p. 214
- (5) WIDNELL, C.C., TATA, J.R.: A Procedure for the Isolation of Enzymically Active Rat-Liver-Nuclei
in: Biochem. J., 92 (1964) p.313
- (6) DOUNCE, A.L.: Enzyme Studies on Isolated Cell Nuclei of Rat Liver
in: J.B.C., 147 (1943) p. 685
- (7) DOUNCE, A.L.: Further Studies on Isolated Cell Nuclei of Normal Rat Liver
in: J.B.C., 151 (1944) p. 221.
- (8) DOUNCE, A.L.: The Isolation and Composition of Cell Nuclei and Nucleoli
in: CHARGAFF, DAVIDSON: The Nucleic Acids Vol. II, Academic Press, New York (1955)

- (9) KROWKE, R., NEUBERT, D.:
¹⁴C-Glucose as a Precursor of Nucleic
 Acids for Studying Embryotoxic Effects
 in vivo
 in: Abstracts of the 4th International
 Congress on Pharmacology, p. 469,
 Basel (1969)
- (10) SEVAG, M.G., LACKMAN, D.B., SMOLENS, J.:
 Isolation of Thymonucleic Acid from
 Different Tissues
 in: J.B.C., 124 (1938) p. 425
- (11) GANDELMAN, B., ZAMENHOF, S., CHARGAFF, E.:
 The Deoxypentose Nucleic Acids of Three
 Strains of Escherichia Coli
 in: B.B.A., 2 (1952) p. 399
- (12) SMITH, J.D., WYATT, G.R.:
 The Composition of some Microbial
 Deoxypentose Nucleic Acids
 in: Biochem. J., 49 (1951) p. 144
- (13) MARKO, A.M., BUTLER, G.C.:
 The Isolation of Sodium Deoxyribo-
 nucleate with Sodium Dodecyl Sulfate
 in: J.B.C., 190 (1951) p. 165
- (14) KAY, E.R.M., SIMMONS, N.S., DOUNCE, A.L.:
 An Improved Preparation of Sodium
 Deoxyribonucleate
 in: J. Am. Chem. Soc., 74 (1952) p. 1724
- (15) KIRBY, K.S.: A New Method for the Isolation of
 Deoxyribonucleic Acids: Evidence on
 the Nature of Bonds between Deoxyri-
 bonucleic Acid and Protein
 in: Biochem. J., 66 (1957) p. 495
- (16) MARMUR, J.: A Procedure for the Isolation of
 Deoxyribonucleic Acid from Micro-
 Organisms
 in: J. Mol. Biol., 3 (1961) p. 208

- (17) SAVITSKY, J.P., STAND, F.:
A Method for the Preparation of
Mammalian Deoxyribonucleic Acid
in: B.B.A., 114 (1966) p. 419
- (18) ARRIGHI, F.E., BERGENDAHL, J., MANDEL, M.:
Isolation and Characterization of
DNA from Fixed Cells and Tissues
in: Exp. Cell Res., 50 (1968) p. 47
- (19) COLTER, J.S., BROWN, R.A., ELLEM, K.A.O.:
Observations on the Use of Phenol
for the Isolation of Deoxyribonu-
cleic Acid
in: B.B.A., 55 (1962) p. 31
- (20) KIRBY, K.S.: The Preparation of Deoxyribonucleic
Acids by the p-Aminosalicylate-
Phenol Method
in: B.B.A., 36 (1959) p. 117
- (21) KIRBY, K.S., COOK, E.A.:
Isolation of Deoxyribonucleic
Acid from Mammalian Tissues
in: Biochem. J., 104 (1967) p. 254
- (22) KIRBY, K.S., FOX-CARTER, E., GUEST, M.:
Isolation of Deoxyribonucleic
Acid and Ribosomal Ribonucleic
Acid from Bacteria
in: Biochem. J., 104 (1967) p. 258
- (23) SAITO, H., MIURA, K.:
Preparation of Transforming Deoxy-
ribonucleic Acid by Phenol Treatment
in: B.B.A., 72 (1963) p. 619
- (24) BASU, S., DASGUPTA, N.N.:
Spectrophotometric Investigation
of DNA in the Ultraviolet
in: B.B.A., 145 (1967) p. 391

- (25) BURTON, K.: A Study of the Conditions and Mechanism of the Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid
in: Biochem. J., 62 (1956) p. 315
- (26) MINTARI, E.R.: Determination and Characterization of Native and Denatured DNA by the Ultraviolet Absorption Spectra
in: J. Biophys.Biochem.Cytol., 18 (1966) p.743
- (27) DASGUPTA, N.N., BASU, S., MISRA, D.N.:
Determination of Nucleic Acids by Ultraviolet Absorption and Fluorimetry
in: J. Am. Chem. Soc., 89 (1967) p. 1366
- (28) MUNROE, H.N., FLECK, A.:
The Determination of Nucleic Acids
in: D. GLICK, Ed., Methods of Biochemical Analysis, Vol. 14, Interscience, N.Y. (1966) p. 113
- (29) SAVITZKY, J.P., STAND, F.:
A Simple Method for Measuring Ribonucleic Acid Content of Preparations of Deoxyribonucleic Acid
in: Nature, 207 (1965) p. 758
- (30) VANECKO, S., LASKOWSKI, M.:
Studies of the Specificity of Deoxyribonuclease I
in: J.B.C., 236 (1961) p. 1135
- (31) SINSHEIMER, R.L.:
The Action of Pancreatic Deoxyribonuclease. I. Isolation of Mono- and Dinucleotides
in: J.B.C., 208 (1954) p. 445

- (32) VANECKO, S., LASKOWSKI, M.:
Hydrolysis of Chains Carrying a
Monoesterified Phosphate on Carbon 5'
in: J.B.C., 236 (1961) p. 3312
- (33) TAMM, C., CHARGAFF, E.:
Specific Requirements for the Action
of Deoxyribonuclease
in: Nature, 168 (1951) p. 916
- (34) COHN, W.E.: Methods of Isolation and Characteri-
zation of Mono- and Polynucleotides
by Ion-Exchange Chromatography
in: S.P. COLOWICK, N.O. KAPLAN, Eds.,
Methods in Enzymology, Vol. 3,
Academic Press, N.Y. (1957) p. 724
- (35) HURST, R.O., BUTLER, G.C.:
The Chromatographic Separation of
Phosphatases in Snake Venoms
in: J.B.C., 193 (1951) p. 91
- (36) SINSHEIMER, R.L., KOERNER, G.C.:
A Purification of Venom Phosphodi-
esterase
in: J.B.C., 198 (1952) p. 293
- (37) WILLIAMS, E.J., SUNG, S., LASKOWSKI, J.F.:
Action of Venom Phosphodiesterase
on Deoxyribonucleic Acid
in: J.B.C., 236 (1961) p. 1130
- (38) DUNN, D.B., SMITH, J.D.:
Effects of the Growth of Escherichia
Coli of 5'-Halogenated Uracils and their
Incorporation into Deoxyribonucleic
Acids
in: Biochem. J., 67 (1957) p. 494
- (39) LITTLE, J.A., BUTLER, G.C.:
The Enzymatic Degradation of Thymo-
nucleic Acid. I. The Preparation of
Oligonucleotides
in: J.B.C., 188 (1951) p. 695

- (40) COHN, W.E., CARTER, C.E.:
The Separation of Adenosine
Polyphosphates by Ion Exchange
and Paper Chromatography
in: J. Am. Chem. Soc., 72 (1950)
p. 4273
- (41) SINSHEIMER, R.L., KOERNER, J.F.:
Ion Exchange Separation of
Deoxyribonucleotides
in: Science, 114 (1951) p. 42
- (42) BUSCH, E.W.: Trennung von Basen, Nucleosiden
und Nucleotiden auf Kationenaustauschern
in: J. Chromatog., 37 (1968) p. 518
- (43) BRAUN, R.: Separation of Bases, Nucleosides
and Nucleotides on Sephadex G-10
in: B.B.A., 142 (1967) p. 267
- (44) RANDERATH, K.: Dünnschicht-Chromatographie von
Nucleotiden an Cellulose-Schichten
in: Angew. Chem., 73 (1961) p. 436
- (45) RANDERATH, K.: Dünnschicht-Chromatographie von
Nucleotiden
in: Angew. Chem., 74 (1962) p. 848
- (46) RANDERATH, K., RANDERATH, E.:
Ion-Exchange Chromatography of
Nucleotides on Poly-(Ethyleneimine)-
Cellulose Thin Layers
in: J. Chromatog., 16 (1964) p. 111
- (47) SOUTHERN, E.M., MITCHELL, A.R.:
Chromatography of Nucleic Acid
Digests on Thin Layers of Cellulose
Impregnated with Polyethyleneimine
in: Biochem. J., 123 (1971) p. 613

- (48) VANDERHEIDEN, B.S.:
Separation of Deoxyribonucleotides
from Ribonucleotides by Paper
Chromatography
in: Anal. Biochem., 22 (1968) p. 231
- (49) DAVIDSON, J.N., SMELLIE, R.M.S.:
Phosphorus Compounds in the Cell.
The Separation by Ionophoresis on
Paper of the Constituents Nucleotides
of Ribonucleic Acids
in: Biochem. J., 52 (1952) p. 594
- (50) SILVER, M.J., RODALEWICZ, I., DUGLAS, Y., PARK, D.
High-Voltage Paper Electrophoresis
of Nucleotides
in: Anal. Biochem., 26 (1970) p. 525
- (51) COHN, W.E.: The Separation of Nucleic Acid
Derivates by Chromatography on Ion-
Exchange Columns
in: CHARGAFF, DAVIDSON, Eds., The
Nucleic Acids, Vol. 1. Academic Press,
N.Y. (1955) p. 211
- (52) EAST, J.L.: Nucleotide Composition of Ribonucleic
Acid by Spectral Analysis and Thin-
Layer Chromatography
in: Anal. Biochem., 24 (1968) p. 409
- (53) AMBELLAN, R.S.:
Changes in Nucleic Acid Distribution
During Neural-Tube Formation in
Amphibian Embryos
in: B.B.A., 80 (1964) p. 8
- (54) CABIB, E., LELOIR, L.F., CARDINI, C.E.:
Uridine Diphosphate Acetylglucosamine
in: J.B.C., 203 (1953) p. 1055
- (55) ABRAMS, R.: An Isotope Dilution Method for Nucleic
Acid Analysis. I. Purines
in: Arch. Biochem., 30 (1951) p. 44

- (56) VISCHER, E., CHARGAFF, E.:
The Composition of the Pentose
Nucleic Acids of Yeast and Pancreas
in: J.B.C., 176 (1948) p. 715
- (57) MARSHAK, A., VOGEL, J.H.:
Quantitative Micro-Analysis of
Nucleic Acid Purines and Pyrimidines
without prior Isolation of the Nucleic
Acids
in: Federation Proceed., 9 (1950) p. 85
- (58) WYATT, G.R.: The Purine and Pyrimidine Composition
of Deoxypentose Nucleic Acids
in: Biochem. J., 48 (1951) p. 584
- (59) WYATT, G.R., COHEN, S.S.:
The Bases of the Nucleic Acids of
some Bacterial and Animal Viruses:
The Occurrence of 5-Hydroxymethyl-
cytosine
in: Biochem., J., 55 (1953) p. 774
- (60) KECK, K., HAGEN, U.:
Trennung von DNA-Bausteinen auf
Celluloseschichten
in: B.B.A., 87 (1964) p. 685
- (61) BEAVEN, G.H., HOLIDAY, E.R., JOHNSON, E.R.:
Optical Properties of Nucleic Acids
and their Components
in: CHARGAFF, DAVIDSON, Eds., The
Nucleic Acids, Vol. 1, Academic
Press, N.Y. (1955) p. 493
- (62) VOLKIN, E., COHN, W.E.:
Estimation of Nucleic Acids
in: D. GLICK, Ed., Methods of Biochemi-
cal Analysis, Vol. 1, Interscience,
N.Y. (1954) p. 287

- (63) KROWKE, R., PIELSTICKER, K., SIEBERT, G.:
A Simple Fractionation Procedure for
Studying the Incorporation of
Radioactively Labelled Precursors
into Mammalian Main Cell Components
in: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.
Pharmak. (in press)(1971)
- (64) KROWKE, R., SIEBERT, G., NEUBERT, D.:
Effects of 5-Fluorodeoxycytidine,
5-Fluoro-uracil and Cycloheximidine
on the Incorporation of ^{14}C -glucose
and ^{32}P into Different Cell Components
of Rat Embryos in vivo
in: Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmak.,
268 (1971) p. 229
- (65) ITZHAKI, S. : Metabolic Studies on the Sugars of
Nucleic Acids. I. The Isolation of
Pyrimidine-Bound Sugars and
Utilization of ($^{14}\text{C}_6$) Glucose for
Ribose Formation in Mammalian Tissues
in vitro
in: B.B.A., 87 (1964) p. 541
- (66) COFFEY, R.G., MORSE, H., NEWBURGH, R.W.:
The Synthesis of Nucleic Acid Consti-
tuents in the Early Chick Embryo
in: B.B.A., 114 (1966) p. 547
- (67) HIATT, H.H., LAREAU, J.:
Studies of Ribose Metabolism VIII.
Pathways of Ribose Biosynthesis in vivo
in Rat, Mouse, and Human Tissues
in: J.B.C., 235 (1960) p. 1241
- (68) KROWKE, R., SIEBERT, G., NEUBERT, D.:
Biochemical Screening Test with ^{14}C -
Glucose and ^{32}P -Phosphate for the
Evaluation of Embryotoxic Effects in
vivo
in: Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmak.,
271 (1971) p. 274

- (69) ITZHAKI, S., WHITTLE, E.D.:
Metabolic Studies on the Sugars of
Nucleic Acids. II. ^{14}C -Labelling
of Ribose and Deoxyribose and its
Comparison with ^{32}P Incorporation
into Ribonucleic Acid and Deoxyribo-
nucleic Acid of Rat-Thymus Cells
in: B.B.A., 87 (1964) p. 554
- (70) CHAUBE, S., MURPHY, M.L.:
The Teratogenic Effects of Cytosine
Arabinoside (AC) on the Rat Fetus
in: Proc.Am.Ass.Cancer Res., 6 (1965)
p. 39
- (71) CHU, M.Y., FISHER, G.A.:
Comparative Studies of Leukemic Cells
Sensitive and Resistant to Cytosine
Arabinoside
in: Biochem. Pharmacol., 14 (1965)
p. 333
- (72) CHU, M.Y., FISHER, G.A.:
A Proposed Mechanism of Action of
1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosine as
an Inhibitor of the Growth of
Leukemic Cells
in: Biochem. Pharmacol., 11 (1962)
p. 423
- (73) KIM, J.H., EIDINOFF, M.L.:
Action of 1- β -D-Arabinofuranosyl-
cytosine on the Nucleic Acid Metabo-
lism and Viability of HeLa Cells
in: Cancer Research, 25 (1965) p. 698
- (74) RITTER, E.J., SCOTT, W.J., WILSON, J.G.:
Teratogenesis and Inhibition of DNA
Synthesis Induced in Rat Embryos by
Cytosine Arabinoside
in: Teratology, 4 (1971) p. 7

- (75) FURTH, J.J., COHEN, S.S.:
Inhibition of Mammalian DNA
Polymerase by the 5-Triphosphate of
1- β -D-Arabinofuranosylcytosine and
the 5-Triphosphate of 9- β -D-Arabi-
furanosyladenine
in: Cancer Research, 28 (1968) p.2061
- (76) SILAGI, S.: Metabolism of 1- β -D-Arabinofuranosyl-
cytosine in L Cells
in: Cancer Research, 25 (1965) p. 1446
- (77) INAGAKI, A., NAKAMURA, T., WAKISAKI, G.:
Studies on the Mechanism of Action of
1- β -D-Arabinofuranosylcytosine as an
Inhibitor of DNA Synthesis in Human
Leukemic Leukocytes
in: Cancer Research, 29 (1969) p. 2169
- (78) ELION, G.B., BURCHI, E., HITCHINGS, G.H.:
Studies on Condensed Pyrimidine Systems.
IX. The Synthesis of some 6-substituted
Purines
in: J. Am. Chem. Soc., 74 (1952) p. 411
- (79) MURPHY, M.L.: Factors Influencing Teratogenic Response
to Drugs. WILSON, WARKANY, Eds., The
University of Chicago Press (1965)
- (80) BIEBER, S., DIETRICH, L.S., ELION, G.B., HITCHINGS, G.H.
MARTIN, D.S.: The Incorporation of 6-Mercaptopurine-
S³⁵ into the Nucleic Acids of Sensitive
and Nonsensitive Transplantable Mouse
Tumors
in: Cancer Research, 21 (1961) p. 228
- (81) HAMPTON, A.: Reactions of Ribonucleotide Derivates
of Purine Analogues at the Catalytic
Site of Inosine 5-Phosphate Dehydrogenase
in: J.B.C. 238 (1963) p. 3068

- (82) McCOLLISTER, R.J., GILBERT, W.R., WYNGAARDEN, J.B.:
Pseudofeedback Inhibition of Purine
Synthesis by 6-Mercaptopurine and
other Purine Analogues
in: J. Clin. Invest.. 41 (1962)
p. 1383

Abkürzungen der Zeitschriften

J.B.C. = Journ. Biol. Chem.

B.B.A. = Biochem. Biophys. Acta

Gerd Bochert
1 Berlin 61
Stresemannstr. 74

LEBENS LAUF

Geburtsdatum:	19. März 1940
Vater:	Fritz Bochert (Kaufmann)
Mutter:	Erica Bochert, geb. Steineck
Sept. 1946-April 1952:	Besuch der 3. Grundschule in Berlin-Tempelhof
April 1952-Okt. 1954:	Besuch des Askanischen Gymnasiums in Berlin-Tempelhof
Okt. 1954-März 1956:	Besuch der 1. Oberschule Technischen Zweiges in Berlin-Tempelhof
Oktober 1956:	Beginn einer Lehre zum Fein- und Elektromechaniker in den Zentralwerkstätten der Technischen Universität Berlin
März 1960:	Facharbeiterbrief der Industrie- und Handelskammer Berlin
April 1960-April 1961:	Beschäftigung als Mechaniker in der Firma Dr. Ing. Kieback u. Peter, Berlin-Britz
April 1961-Jan. 1963:	Verschiedene Tätigkeiten und autodidaktische Vorbereitung auf die Reifeprüfung
Mai 1963:	Reifeprüfung für Schulfremde
Mai 1963-März 1965:	Praktikum als Apothekerpraktikant in der St. Georg-Apotheke, Berlin-Tempelhof
April 1965-Sept. 1966:	Vertretungen in verschiedenen Apotheken
WS 1966/67 - SS 1970:	Pharmaziestudium an der FU-Berlin
April 1970:	Staatsexamen
Juli 1970 - Dez. 1971:	Doktorand im Pharmakologischen Institut der FU-Berlin, Sonderforschungsbereich 29 (Embryonal-Pharmakologie)

DIFO-DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216